

Aus der Klinik für Innere Medizin  
Schwerpunkt Pneumologie  
(Direktor: Prof. Dr. med. Claus Vogelmeier)

des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg

# **Der Effekt von Infliximab auf TNF- $\alpha$ - induzierte Mucin-Sekretion in humanen Atemwegsepithelien**



## **Inaugural - Dissertation**

zur  
Erlangung des Doktorgrades der gesamten Humanmedizin  
dem Fachbereich Medizin der  
Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von  
Carsten Mand  
aus Homberg/Efze  
Marburg, 2011



Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Philipps-Universität Marburg

am: 23.05.2011

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

**Dekan:** Prof. Dr. M. Rothmund

**Referent:** Herr Prof. Dr. Vogelmeier

**1. Korreferent:** Herr Prof. Dr. Dietrich

**Meiner Familie**

**in Liebe und Dankbarkeit**

<b>1</b>	<b><u>EINLEITUNG</u></b>	<b><u>7</u></b>
1.1	ATEMWEGSEPITHEL	8
1.2	MUCUS-ZUSAMMENSETZUNG UND MUCIN-GLYKOPROTEINE (MUCINE)	9
1.3	ATEMWEGS-MUCINE	11
1.4	MUCIN-EXPRESSION BEI ATEMWEGSERKRANKUNGEN	12
1.4.1	CHRONISCH OBSTRUKTIVE ATEMWEGSERKRANKUNG (COPD)	13
1.4.2	ASTHMA BRONCHIALE	13
1.4.3	CYSTISCHE FIBROSE (CF)	14
1.5	MUCIN-GEN-REGULATION DURCH INFLAMMATORISCHE MEDIATOREN	15
1.5.1	TUMOR NEKROSE FAKTOR ALPHA	17
1.5.2	LIPOPOLYSACCHARID	20
1.5.3	LYMPHOTOXIN ALPHA	21
1.6	INFLIXIMAB	22
<b>2</b>	<b><u>FRAGESTELLUNG</u></b>	<b><u>24</u></b>
<b>3</b>	<b><u>MATERIAL UND METHODEN</u></b>	<b><u>26</u></b>
3.1	ZELLINIEN UND ZELLKULTUR	26
3.1.1	ZELLINIEN	26
3.1.1.1	16HBE14O-	26
3.1.1.2	1HAEO-	26
3.1.1.3	NCI-H292	26
3.1.2	ZELLKULTUR	27
3.1.2.1	AIR/LIQUID INTERFACE (ALI)	27
3.1.2.2	ZELLKULTURMEDIENTEN	29
3.1.3	STIMULATION DER ZELLEN	30
3.2	PROBEN-VORBEREITUNG	31
3.3	WESTERN BLOT ANALYSE	31
3.3.1	ANTIKÖRPER	32
<b>4</b>	<b><u>ERGEBNISSE</u></b>	<b><u>35</u></b>
4.1	OPTIMIERUNG DES VERSUCHSAUFBAUS	35
4.1.1	VORBEREITUNG DER WELLS	35
4.1.2	VERSCHIEDENE ZELLKULTURMEDIENTEN	36
4.1.3	GEWINNUNG DER PROBEN	41
4.2	STIMULATION DER MUCIN-SEKRETION DURCH TNF-ALPHA	44
4.3	STIMULIERUNG DER MUCIN-SEKRETION DURCH ANDERE FAKTOREN	47
4.4	HEMMUNG DER MUCIN-SEKRETION MIT INFLIXIMAB	49
4.4.1	HEMMUNG BEI STIMULATION MIT TNF-ALPHA	49
4.4.2	HEMMUNG BEI STIMULATION MIT ANDEREN MEDIATOREN	53

<b>5</b>	<b><u>DISKUSSION</u></b>	<b>55</b>
<b>5.1</b>	<b>DISKUSSION DER VERSUCHSERGEBNISSE</b>	<b>55</b>
5.1.1	VERSUCHSAUFBAU	55
5.1.2	TNF-ALPHA STIMULIERT DIE MUCIN-SEKRETION	56
5.1.3	ENTZÜNDUNGBEDINGTE MUCIN-SEKRETION LÄSST SICH MIT INFLIXIMAB HEMMEN	57
<b>5.2</b>	<b>KRITISCHE WÜRDIGUNG DER EIGENEN UNTERSUCHUNGEN UND ERGEBNISSE</b>	<b>60</b>
<b>5.3</b>	<b>BEDEUTUNG DER UNTERSUCHUNG, SCHLUSSFOLGERUNG, KONSEQUENZEN UND AUSBLICK</b>	<b>62</b>
<b>6</b>	<b><u>ZUSAMMENFASSUNG</u></b>	<b>63</b>
<b>6.1</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>63</b>
<b>6.2</b>	<b>FRAGESTELLUNG</b>	<b>63</b>
<b>6.3</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>63</b>
<b>6.4</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>63</b>
<b>6.5</b>	<b>SCHLUSSFOLGERUNG</b>	<b>64</b>
<b>7</b>	<b><u>SUMMARY</u></b>	<b>65</b>
<b>7.1</b>	<b>INTRODUCTION</b>	<b>65</b>
<b>7.2</b>	<b>PROBLEM</b>	<b>65</b>
<b>7.3</b>	<b>METHODS</b>	<b>65</b>
<b>7.4</b>	<b>RESULTS</b>	<b>65</b>
<b>7.5</b>	<b>DISCUSSION</b>	<b>66</b>
<b>8</b>	<b><u>LITERATURVERZEICHNIS</u></b>	<b>67</b>
<b>9</b>	<b><u>ANHANG</u></b>	<b>76</b>
<b>9.1</b>	<b>LEBENS LAUF</b>	<b>76</b>
9.1.1	PERSÖNLICHE DATEN	76
9.1.2	WERDEGANG	76
<b>9.2</b>	<b>ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS</b>	<b>78</b>
<b>9.3</b>	<b>DANKSAGUNGEN</b>	<b>80</b>
<b>9.4</b>	<b>VERZEICHNIS DER AKADEMISCHEN LEHRER</b>	<b>81</b>

## 1 Einleitung

In den vergangenen Jahren hat die Bedeutung der chronischen obstruktiven Atemwegserkrankungen stark zugenommen. So wird angenommen, dass im Jahr 2020 die chronisch obstruktive Lungenerkrankung (COPD) die dritthäufigste Todesursache weltweit ist, während sie im Jahr 1990 noch den sechsten Platz belegte (24). Die Prävalenz von Asthma bronchiale hat sich in den letzten 20 Jahre beinahe verdoppelt, so dass in den Vereinigten Staaten jetzt schätzungsweise acht bis zehn Prozent der Bevölkerung betroffen sind (12). Neben den Einschränkungen der Lebensqualität für die Patienten verlangen auch die immensen Kosten für die Gesundheitssysteme nach neuen Therapieansätzen.

Bei einer Inhalation von etwa 500 Litern Luft stündlich werden die Atemwege bis zu 25 Millionen Partikeln Ruß, Staub, Microben und Allergenen ausgesetzt. Während man das Atemwegsepithel früher nur für eine rein physische Barriere hielt, hat man in den vergangenen Jahrzehnten seine große Bedeutung in der angeborenen Immunität und der Infektabwehr erkannt. Die erste Abwehrlinie zum Schutz vor einer Schädigung der Schleimhaut ist die Produktion von Mucus. Mucus in den Atemwegen ist eine wichtige Komponente des körpereigenen Abwehrsystems und bildet eine schützende Barriere zwischen Atemwegsepithel und der Aussenwelt. Er ist ein viskoelastisches Gel, das einen dünnen Film auf der Oberfläche der Atemwege bildet, und besteht zu einem Grossteil aus Wasser und Ionen, zu einem kleineren Teil aus Proteinen, die von den Atemwegsepithelien abgesondert werden, darunter Mucin-Glykoproteine, Lysozym, Lactoferrin, Defensine, Kallikrein, Antiproteasen, IgA, IgG, Proteoglykane und Lipide (45). Für optimale Effizienz bei der Interaktion mit dem Flimmerepithel benötigt Mucus eine bestimmte Kombination aus Viskosität und Elastizität (Viskoelastizität). Viskosität ist ein Maß für die Zähflüssigkeit und der Kehrwert der Fluidität. Elastizität ist die Eigenschaft eines Stoffes, unter Energieeinwirkung von aussen seine Form zu verändern und nach Wegfall der einwirkenden Kraft seine Ursprungsform wieder anzunehmen. Unter normalen Umständen bildet Mucus auf der Oberfläche der Atemwegsepithelien eine klebrige

Gelschicht, die Partikel wie Fremdkörper, Bakterien und Viren auffängt und über Zilienbewegungen der Zellen aus dem Atemtrakt befördert, was man mukoziliäre Clearance nennt (32). Erreicht der Mucus den Kehlkopf wird er entweder verschluckt und im Gastrointestinaltrakt abgebaut oder bei großen Mengen im Rahmen von akuten oder chronischen Atemwegserkrankungen als Sputum abgehustet.

In gesunden Atemwegen besteht die epitheliale Oberfläche zu einem kleinen Teil aus Becherzellen und zu einem großen Teil aus Flimmerepithel. Im Rahmen einer Infektion z.B. erhöht das Atemwegsepithel seine Fähigkeit, Mucus zu bilden und abzusondern (u.a. durch Becherzell-Metaplasie), so dass Sputum produziert und abgehustet werden kann (30). Bei Abklingen der Infektion bilden sich auch die Becherzellen zurück und es wird weniger Schleim produziert.

Man nimmt an, dass Mucus in den Atemwegen eine flüssige Doppelschicht bildet, eine oben gelegene Gelschicht und eine tiefer gelegene, wässrige Sol-Schicht (32). Des Weiteren hat Mucus eine antioxidative Funktion. Viele dieser funktionellen und viskoelastischen Eigenschaften von Mucus verdankt er seiner führenden makromolekularen Komponente, den Mucin-Glykoproteinen.

### **1.1 Atemwegsepithel**

Es gibt wenigstens acht verschiedene Zellarten in den Atemwegen (30). Für die Becherzellen ist die Differenzierung der Hauptweg bei der Produktion neuer Becherzellen, der Hauptweg bei der Karzinomentstehung ist die Zellteilung der Becherzellen. Die serösen Basalzellen und die Clara-Zellen werden als die wichtigsten Vorläuferzellen angesehen, da sie sich teilen und einen Reifungsprozess zu Becher- oder Flimmerzellen durchmachen können. Becherzellen findet man im Epithel der oberen und unteren Atemwege (30). Ihre Hauptfunktion ist die Sekretion von mukösen Glykoproteinen (Mucine), die sich mit anderen Proteinen, Lipiden in einer wässrigen Lösung verbinden, die als Mucus bezeichnet wird (47). Es gibt viele Entzündungsmediatoren, Reizgase und andere Stoffe, die eine Hypersekretion von Mucinen auslösen.



Die Zahl der Becherzellen in den Atemwegen steigt bei den verschiedensten Reizungen, darunter Zigarettenrauch, Reizgase, Entzündungsmediatoren und bakterielle Produkte, dramatisch an (46). Diese neuen Becherzellen scheinen eher durch eine Differenzierung aus nicht granulierten Vorläuferzellen zu entstehen als durch Zellteilung der Becherzellen (46). Diese zahlenmäßige Zunahme führt auch zu einer erhöhten Mucin-Genexpression und Mucin-Produktion. Sind die Atemwege der reizenden Substanz nicht mehr ausgesetzt, kommt es zu einer Erholung mit einer zahlenmäßigen Abnahme der Becherzellen.

Seröse und Clara-Zellen gibt es in normalem Lungengewebe. Eine relative Abnahme dieser Zelltypen bei der Becherzellmetaplasie scheint ein wichtiger Teil der Pathophysiologie der obstruktiven Atemwegserkrankungen zu sein, da sie eine ganze Reihe anti-inflammatorischer, immunmodulatorischer und antibakterieller Moleküle bilden, die für die Abwehr entscheidend sind (30). So kommt es nicht nur zu einer Mucus-Hypersekretion sondern auch zu einer Abnahme der serösen und Clara-Zellen und somit zu einer weiteren Beeinträchtigung der Infektabwehr.

## **1.2 Mucus-Zusammensetzung und Mucin-Glykoproteine (Mucine)**

Mucus in den Atemwegen ist eine heterogene Mischung aus sekretorischen Polypeptiden, Zellen und Zellabfall, die im Flüssigkeitsfilm auf dem Atemwegsepithel liegen oder angebunden sind an oligomerische Mucin-Komplexe. Mucine sind große Glykoproteine von einigen hundert bis zu mehreren Tausend kDa. Sie sind stark glykosiliert mit heterogenen O-gebundenen Oligosacchariden, die etwa 70 – 80% der molekularen Masse ausmachen (34; 48). Mucine werden von Becherzellen sowie mukösen und serösen Zellen in submukosalen Drüsen gebildet. Im bronchialen Teil der Atemwege bilden hauptsächlich Becherzellen die Mucine, die mit Wasser in sekretorischen Granula gespeichert und in das Atemwegslumen ausgeschieden werden. In den großen Atemwegen werden Mucine auch von submukösen Drüsen gebildet. Während Becherzellen hauptsächlich MUC5AC und bei Atemwegsreizung auch MUC5B und etwas MUC2 produzieren, dominiert in den submukösen Drüsen das MUC5B

mit weniger MUC5AC und MUC7 (14). Wegen ihrer komplexen Struktur war es schwierig, sie zu isolieren und biochemisch zu analysieren. Bis 1997 konnten die neun humanen Mucin-Gene (MUC) isoliert werden.

Aus den DNA-Sequenzen der humanen MUC-Gene und dem Vergleich mit homologen Genen von Nagern wurden einige Anteile der Mucin-Glykoproteine als wichtige funktionelle Domänen identifiziert. Eine allen Mucinen gemeinsamer Anteil ist die Tandem-Wiederholungs-Sequenz, die größte Domäne innerhalb des Mucin-Moleküls. Diese Domäne besteht aus Tandem-Wiederholungen von Sequenzen, die reich an Serin und Threonin sind und als Orte für die O-gebunden Glykosilierung dienen. Diese Tandem-Wiederholungs-Sequenzen unterscheiden sich in Größe und Anzahl der Wiederholungen bei den einzelnen MUC-Genen und auch zwischen den menschlichen und Nagetier-Entsprechungen der MUC-Gene. Da die Tandem-Wiederholungs-Sequenzen der Ort für die Glykosilierung sind, bestimmt die jeweilige Aminosäuresequenz jedes Mucins das heterogene und einzigartige Glykosilierungs-Muster für jedes Mucin. Die Oligosaccharid-Strukturen, die mit dieser Domäne verbunden sind, haben wichtige Funktionen als Liganden für bakterielle oder virale Adhesine (31; 57; 61).

Man kann Mucine in zwei Klassen einteilen: sekretorische und membrangebundene Mucine. Sekretorische, gel-bildende Mucine (MUC2, 5AC, 5B und 6) haben cystein-reiche Domänen in ihren Amino- und Carboxyl-Termini, die Ähnlichkeit mit cysteinreichen Domänen des von-Willebrand-Faktors haben. Diese Domänen sind Stellen der Oligomerisation über Disulphid-Brücken. Die multimerische Struktur ist eine bedeutende Eigenschaft der sekretorischen Mucine, die das Mucus-Gel bilden. MUC5B z.B. kann sowohl in der Gel- als auch in der Sol-Schicht vorliegen. Hier zeigte sich, dass das MUC5B-Mucin in der Sol-Phase kleiner war als das in der Gelphase, was auf Unterschiede in der Oligomerisation und/oder Degradation hinweist (31; 57; 61).

Im Gegensatz dazu fehlen MUC7, einem sekretorischen Mucin, das von serösen Zellen der submucosalen Drüsen gebildet wird, diese cystein-reichen D-Domänen. Es formt keine Multimere und ist kein Bestandteil der Gel-Phase der Atemwegssekretionen (61). Nach ihrer Synthese werden sie in intrazellulären sekretorischen Granula gespeichert bis sie mittels Exozytose in das Lumen abgegeben werden.

Membrangebundene Mucine (MUC1, 3, 4 und 13) besitzen einen hydrophoben, transmembranösen Bereich, eine cytoplasmatische Domäne mit Orten für Tyrosinphosphorylierung und – außer MUC1 – Domänen, die dem epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) ähneln. Der Mucin-Anteil auf der Oberfläche der Plasmamembran nimmt Teil an der Zelladhäsion, an der Bindung von Pathogenen und der Signaltransduktion (9; 36).

### **1.3 Atemwegs-Mucine**

Mucine sind die wichtigsten Glykokonjugate in Atemwegssekretionen gesunder Menschen ohne Atemwegserkrankungen (15). In der normalen Lunge eines Erwachsenen werden wenigstens acht Mucin-Gene, MUC1, 2, 4, 5AC, 5B, 7, 8 und 13, als mRNA exprimiert. Mit Hilfe der in-situ-Hybridisierung ist das normale Expressionsmuster verschiedener MUC-Gene auf einige Zellarten der oberen und unteren Atemwege beschränkt. MUC1 und MUC4 gibt es in allen oberflächlichen Atemwegsepithelzellen. MUC5AC wird hauptsächlich von Becherzellen produziert, MUC5B von mukösen Zellen der submukosalen Drüsen (8). MUC7 wird von serösen Zellen der submukosalen Drüsen exprimiert (6). MUC2, MUC5AC und MUC5B sind in einem Gen-Komplex auf Chromosom 11p15.5 lokalisiert (40).

Die Untersuchung der Expression der entsprechenden MUC-Glykoproteine in den Atemwegen ist limitiert durch die Verfügbarkeit von Antikörpern, die spezifisch gegen die MUC-Protein-Gerüste (Apoproteine) sind, und durch die Oligosaccharide, die an das Proteingerüst gebunden sind und die Bindung von Antikörpern behindern. Kürzlich wurden spezifische Antikörper für MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC5B und MUC7 verfügbar, die komplett glykosilierte MUC-

Glykoproteine nachweisen. Mit Hilfe dieser Antikörper haben verschiedene Untersucher gezeigt, dass MUC5AC und MUC5B die wichtigsten Glykoproteine in normalen Atemwegssekretionen sind (56).

#### **1.4 Mucin-Expression bei Atemwegserkrankungen**

Es ist seit langem bekannt, dass die Obstruktion der Atemwege mit Mucus ein Hauptgrund für Morbidität und Mortalität bei verschiedenen chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen ist. Zu diesen Krankheiten gehören die chronische Bronchitis, Asthma bronchiale und zystische Fibrose (CF). Während in gesunden Atemwegen die Produktion von Mucus eine Schutzfunktion hat, trägt die Hypersekretion und Veränderungen der Zusammensetzung bei diesen Erkrankungen zur Pathogenese bei. Chronische Überproduktion von Mucus geht einher mit einer Verschlechterung der Lungenfunktion und Steigerung der Morbidität bei chronisch obstruktiver Lungenerkrankung (COPD) (15). Sputum-Produktion und die damit verbundene Mucus-Obstruktion der Atemwege spielt eine Hauptrolle in der Pathogenese des schweren Asthma bronchiale (37; 39). Die Atemwegs-Pathologie bei cystischer Fibrose ist zunächst gekennzeichnet durch eine Obstruktion der kleinen Atemwege und mit fortschreitender Erkrankung auch der großen Atemwege mit starker neutrophiler Entzündungsreaktion (23; 26). Mit Hilfe der Kultursysteme menschlicher Atemwegsepithelien, spezifischer Antikörper und in-vivo-Modellen chronischer Atemwegserkrankungen konnte gezeigt werden, dass Mucin-Glykoproteine eine kritische Rolle bei der Becherzell-Hyperplasie, Mucus-Hypersekretion und der Atemwegsobstruktion durch Mucus spielen. In einem Maus-Modell für Asthma konnte gezeigt werden, dass die MUC5AC-Expression der Hauptmechanismus für die Entwicklung einer Becherzell-Metaplasie bei allergischen Mäusen ist (64).

#### **1.4.1 Chronisch obstruktive Atemwegserkrankung (COPD)**

Die chronisch obstruktive Atemwegserkrankung (Chronic Obstructive Pulmonary Disease – COPD) ist eine weit verbreitete Erkrankung. Man schätzt, dass sie weltweit die vierthäufigste Todesursache ist, in Deutschland lag sie 2002 auf Rang 7. Man erwartet, dass sie bis zum Jahr 2020 an dritter Stelle der Todesursachen weltweit steht (1).

Sie beinhaltet drei überlappende Krankheitsbilder: die chronische Bronchitis, chronische Bronchiolitis und das Emphysem. In den Atemwegen von COPD-Patienten findet sich ein Überschuss an Mucus, der einher geht mit einer Vermehrung des Mucus-bildenden Gewebes (49). So ist die Becherzell-Metaplasie eine Kardinaleigenschaft der chronischen Bronchitis. Auch die submukösen Drüsen weisen eine Metaplasie auf, und die Zahl der Drüsen korreliert mit der Menge des luminalen Mucus. Während das Abhusten des Sputums hilft, den überschüssigen Mucus aus den großen Atemwegen zu entfernen, führt die beeinträchtigte mukoziliäre Clearance zu einer Akkumulation des Mucus in den kleinen Atemwegen (Bronchiolen mit  $< 2$  mm Durchmesser). Es konnte ein Zusammenhang zwischen chronischem Auswurf und einer Verschlechterung der Lungenfunktion, Hospitalisierung und Mortalität festgestellt werden (58).

#### **1.4.2 Asthma bronchiale**

Asthma bronchiale ist ein chronisch entzündlicher Zustand der Atemwege, der charakterisiert ist durch eine Einschränkung des Luftflusses, die entweder spontan oder unter Therapie wenigstens zum Teil reversibel ist. Hyperplasie der sekretorischen Zellen und Mucus-Obstruktion der Atemwege sind ebenfalls Hauptbestandteile der Pathologie bei Asthma bronchiale (19; 39). Zudem ist das Atemwegsepithel infiltriert mit mononukleären Zellen, hauptsächlich CD4<sup>+</sup> T-Zellen, und Eosinophilen. Im Lumen der Atemwege findet sich Mucus gemischt mit aktivierten Makrophagen, Lymphzyten, Eosinophilen und abgeschilferten Epithelzellen. Bei Asthmatikern sind selbst bei milden Formen ca. 20 – 25 % des Atemwegsepithels Becherzellen (39). Dieses Atemwegs-Remodeling und die

chronisch entzündliche Reaktion führen zu einer Überempfindlichkeit der Atemwege, die definiert ist durch eine verstärkte bronchokonstriktive Antwort auf einen unspezifischen Stimulus.

Daher vermutet man eine genetische Verbindung zu Polymorphismen in den MUC-Genen. Bisher konnte eine solche Verbindung nicht nachgewiesen werden, aber dennoch gibt es wahrscheinlich quantitative Veränderungen in der Expression zumindest zweier wichtiger Atemwegs-Mucine, MUC5AC und MUC5B. Beide Glykoproteine wurden in den Atemwegssekretionen bei Asthma bronchiale nachgewiesen, wobei MUC5AC unproportional stark erhöht war (31). In einem Meerschweinchen-Modell für Asthma konnte gezeigt werden, dass eine Antigen-Stimulation eine erhöht Genexpression (z.B. Eotaxin, MUC2 und MUC5AC) hervorruft (37). In einer Studie konnte gezeigt werden, dass Asthmatiker eine Becherzellhyperplasie haben und eine erhöhte Expression von MUC5AC-mRNA und des Glykoproteins. In den Atemwegssekretionen von Asthmatikern werden also die gleichen MUC-Glykoproteine gebildet, nur höher konzentriert. So findet man in den intrazellulären Speichern der Becherzellen dreimal mehr Mucin als bei Gesunden (39). Bisher ist nicht bekannt, ob ein Zusammenhang besteht zwischen erhöhter Mucin-Expression und dem Schweregrad des Asthma.

#### **1.4.3 Cystische Fibrose (CF)**

Cystische Fibrose (CF), auch als Mukoviszidose bekannt, ist die häufigste autosomal rezessive Erbkrankheit der weißen Erdbevölkerung und tritt mit einer Frequenz von etwa 1 : 2500 Lebendgeburten auf (44). In den Atemwegen ist die cystische Fibrose gekennzeichnet durch eine eingeschränkte mukoziliäre Clearance, die zu wiederholten bakteriellen Kolonisierungen, Atemwegsinfektionen und chronischer Obstruktion führt (43). Diese Veränderungen konnten mit einer Dysfunktion oder dem Fehlen des CF Transmembran-Regulators (CFTR), einem cAMP-abhängigen Chlorid-Kanal, in Verbindung gebracht werden. In den Atemwegen ist CFTR auf der apikalen Oberfläche zilientragender Zellen lokalisiert, wo er das Flüssigkeitsvolumen auf der Oberfläche des Epithels durch eine negativ regulierende Interaktion mit dem

ameliorid-sensitiven epithelialen Natriumkanal (ENaC) beeinflusst. Ohne die Einwirkung des CFTR kommt es durch überschüssige Aktivität des ENaC zu einer Austrocknung der luminalen Oberfläche, einer Beeinträchtigung der Mucus-Clearance und einem Anhaften der Mucus-Schicht an der epithelialen Oberfläche (23; 26; 49).

Sind Patienten mit cystischer Fibrose einer bakteriellen Reizung ausgesetzt, kommt es zu einem Anstieg von IL-13 und konsekutiv zu einem Abfall von TNF- $\alpha$  (25). Die Pathologie bei cystischer Fibrose ist gekennzeichnet durch eine Besiedlung des Mucus mit pathogenen Organismen und veränderten post-translationalen Modifikationen mit erhöhter Sulfatation und geringerer Sialysation, was bakterielle Bindungen beeinflussen könnte (17). Hypothesen zur Erklärung dieses Zustandes beinhalten eine veränderte Glykosyltransferase-Aktivität oder MUC-Expression.

MUC5AC und MUC5B sind beide im Sputum von CF-Patienten nachweisbar, und verschiedene Studien haben gezeigt, dass MUC5B verglichen mit MUC5AC erhöht ist und eine andere Form des MUC5B gebildet wird als bei Gesunden (16; 29; 31). Interessanterweise sind die Konzentrationen von MUC5AC und MUC5B trotz stark erhöhter Produktion bei CF-Patienten im Trachealsekret von beatmeten Patienten mit CF im Vergleich zu beatmeten Patienten ohne CF erniedrigt (27), bei CF-Patienten sind beide Mucine bei einer Exazerbation verglichen mit einer stabilen Phase der Erkrankung erhöht (26).

### **1.5 Mucin-Gen-Regulation durch inflammatorische Mediatoren**

Obwohl eine ganze Reihe verschiedener Faktoren, darunter Arachidonsäure-Metaboliten, Gerinnungsfaktoren, Akut-Phase-Proteine und antimikrobielle Peptide, an der angeborenen Immunantwort beteiligt sind, stellen die Cytokine die wohl größte und pleiotrope Gruppe solcher Mediatoren dar. Die Einleitung, Aufrechterhaltung und Durchführung der körpereigenen Abwehr der Lunge ist abhängig von der interzellulären Kommunikation durch Cytokine. Gemeinsam mit anderen Faktoren tragen Cytokine zur Erkennung von Pathogenen, der

Rekrutierung von neutrophilen und mononuklearen Zellen und der Entfernung eindringender Mikroorganismen bei.

Die Signalübertragung geschieht durch Rezeptor-Ligand-Interaktionen, die auf verschiedenen Zellarten unterschiedliche Antworten auslösen. So kann z.B. eine bestimmte Zellpopulation auf Cytokin-Stimulation hin spezifische andere Cytokine abgeben, von denen wiederum eine weitere Zellpopulation stimuliert wird, was zu dem Begriff der „Cytokin-Vernetzung“ führte. Die Zielzelle wiederum kann ein Cytokin produzieren, das dann als Feedback-Signal für die initiiierende Zelle fungiert oder weitere Signal-Moleküle abgeben, die eine andere Zellpopulation zum Ziel hat. Zellen der angeborenen Abwehr, wie z.B. neutrophile Granulozyten oder Monozyten können zu einem bestimmten Ort gerufen und aktiviert werden, was eine weitere Verstärkung der Cytokin-Kaskade der örtlichen Zellen zur Folge hat (55).

Zur Untersuchung der Verbindung zwischen Becherzellmetaplasie und erhöhter Mucin-Produktion werden *in-vitro*-Modelle mit Atemwegs-Zelllinien verwendet. Verschiedene Karzinom-Zelllinien der Atemwege exprimieren mRNA und Glykoproteine der wichtigsten Atemwegs-Mucine. Besonders NCI-H292 (ein Mukoepidermoid-Karzinom) wurde zur Untersuchung der Regulation von MUC2 und MUC5AC benutzt (35; 51). Normale menschliche Atemwegsepithelzellen, in einem Air-Liquid-Interface kultiviert, bilden einen mukoziliären Phenotyp, der dem in den Atemwegen ähnelt. Mit Hilfe dieser Systeme entstehen immer mehr Daten, die darauf hindeuten, dass inflammatorische Mediatoren und Cytokine die Expression der MUC-Gene und MUC-Glykoproteine steigern.

Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  induziert über die Bindung an spezifische Rezeptoren und eine intrazelluläre Signalkaskade, die letztlich in einer Aktivierung von nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) und c-Jun resultiert, die Expression von MUC2 und MUC5AC. IL9, ein Th2-Cytokin, steigert die MUC5AC-Expression, ebenso wie Acrolein, Prostaglandin E2 und I5-Hydroxyeicosatetranoidsäure (7). Oxidativer Stress und aktivierte Neutrophile können ebenfalls die MUC5AC-Expression über eine



Aktivierung des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors erhöhen (51). Dexamethason schließlich senkt die MUC2- und MUC5AC-Expression und unterstützt somit die Rolle der Kortikosteroide in der Senkung der Mucin-Produktion.

Auch gram-positive und gram-negative Bakterien und Endotoxine steigern die MUC2- und MUC5AC-Expression über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B über den MAP-Kinase-Weg. Im Gegensatz zu dieser Transkriptions-Regulation erhöht TNF- $\alpha$  die MUC5AC-Expression über einen posttranskriptionalen Mechanismus, der die Stabilität der mRNA steigert. Dieser Mechanismus, der wie beschrieben auch für TNF- $\alpha$  zutrifft, wurde zuerst für Neutrophile Elastase beschrieben (59).

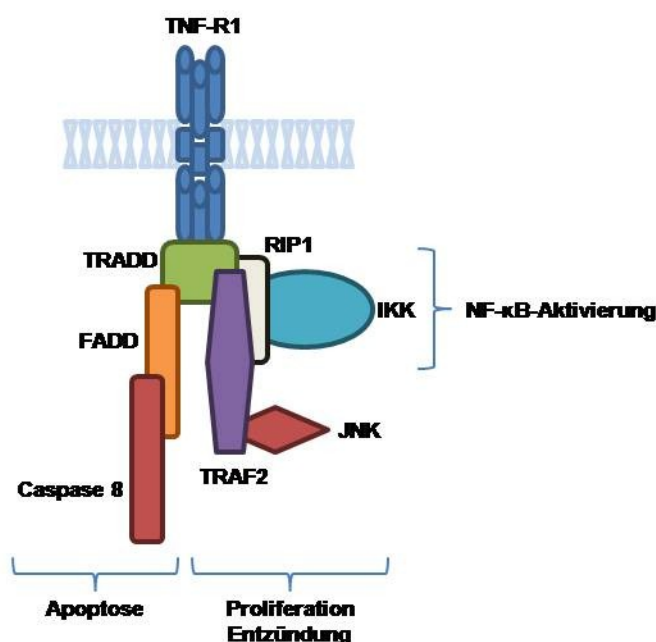
Die MUC5AC-Genexpression und -Proteinproduktion kann bei der humanen Atemwegszelllinie NCI-H292-Zellen auch durch Zigarettenrauch gesteigert werden, indem Zigarettenrauch liganden-abhängige EGRF-Phosphorylierung und damit die MUC5AC-Expression induziert (51).

### **1.5.1 Tumor Nekrose Faktor alpha**

Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ist ein wichtiges proinflammatorisches Zytokin, dem man eine Rolle in der Pathogenese vieler Erkrankungen zuschreibt, darunter Sepsis, Diabetes mellitus, Krebserkrankungen, Osteoporose, Multiple Sklerose und rheumatoide Arthritis. Zu den von TNF- $\alpha$  beeinflussten Erkrankungen der Atemwege gehören Entzündungen, Asthma bronchiale und ARDS (acute respiratory distress syndrom).

TNF- $\alpha$  ist ein Heterotrimer, das aus 157 Aminosäure-Untereinheiten besteht und von vielen Zelltypen wie aktivierten Makrophagen, Monozyten, Lymphozyten, Keratinozyten, Fibroblasten, aber auch Atemwegsepithelien (3; 33) produziert wird. Zu seinem breiten Wirkungsspektrum gehören Lymphozyten- und Leukozyten-Aktivierung und -Migration, Fieber, Akute-Phase-Antwort,

Zellproliferation, Zelldifferenzierung und Apoptose, wobei eine Unterdrückung der Apoptose eine Entzündungsreaktion zur Folge hat (4).



**Abbildung 1** • Schematische vereinfachte Darstellung der Signaltransduktion über den TNF- $\alpha$ -Rezeptor 1 (TNF-R1). Nach Bindung von TNF- $\alpha$  an den Rezeptor bindet dieser an TNFR-associated death domain (TRADD) protein und von dort über einen der drei Wege ([FADD], [RIP1], [TRAF2]) zu Apoptose, Proliferation, Entzündungsreaktion und NF- $\kappa$ B-Aktivierung. Der Übersichtlichkeit halber wurden Zwischenschritte und Interaktionen nicht berücksichtigt.

Die Signalübertragung findet über zwei Rezeptoren an der Zelloberfläche statt, TNF-R1 und TNF-R2, von denen TNF-R1 die meisten biologischen Antworten von TNF- $\alpha$  vermittelt (Abbildung 1). Die Bindung von TNF- $\alpha$  an die extrazelluläre Domäne von TNF-R1 führt intrazellulär zu einer Rekrutierung zunächst von TNF-R1-associated death domain protein (TRADD), das als Plattform für die Bindung von wenigstens drei weiteren Mediatoren (receptor-interacting protein 1 [RIP1], Fas-associated death domain protein [FADD] und TNF-receptor-associated factor 2 [TRAF2]) dient. Diese Mediatoren sind für die Signalübertragung verantwortlich. So rekrutiert z.B. FADD die Caspase-8 zu dem TNF-R1-Komplex, die dort aktiviert wird und eine zur Apoptose führende Protease-Kaskade initiiert. TRAF2 rekrutiert

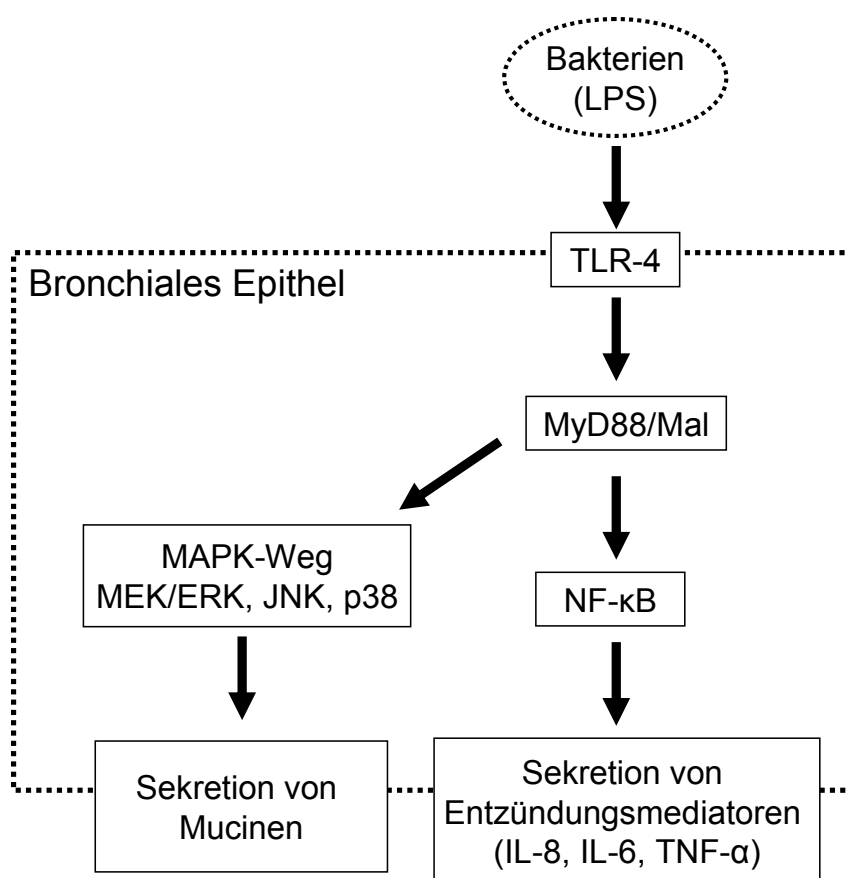
cellular inhibitor of apoptosis protein-1 (cIAP-1) und cIAP-2, zwei antiapoptotische Proteine, und führt über eine Reihe von Kinasen über die c-Jun-NH<sub>2</sub>-terminale-Kinase (JNK) zu einer Phosphorylierung von c-Jun mit Erhöhung seiner Transkriptions-Aktivität. Schließlich führt RIP1 zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B). Es findet ein intensiver Austausch zwischen den von TNF-R1 ausgehenden Signalwegen zur Apoptose, NF- $\kappa$ B- und JNK-Aktivierung statt. In Abwesenheit der NF- $\kappa$ B-Aktivität z.B. tendieren Zellen eher zur TNF-induzierten Apoptose, wobei eine Steigerung der NF- $\kappa$ B-Aktivität gegen Apoptose schützt. Letztlich ist dieses Zusammenspiel von NF- $\kappa$ B und c-Jun mitverantwortlich für die Expression von Genen, die entscheidend sind für unterschiedliche biologische Prozesse, wie u.a. Zellwachstum und -tod, Differenzierung, Onkogenese sowie Immun-, Entzündungs- und Stressreaktionen (11). TNF- $\alpha$  kann in den Atemwegen viele potentiell schädliche Wirkungen haben: gesteigerte Expression von Adhäsions-Molekülen, Bronchokonstriktion, pulmonale Ödeme und Stimulierung der Produktion von Zytokinen und Lipid-Mediatoren. Ausserdem kann TNF- $\alpha$  eine Sekretion von Mucinen in den Atemwegen auslösen (2; 53). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass TNF- $\alpha$  eine dosisabhängige Hypersekretion der MUC-2-Genexpression in Atemwegsepithelien (NCI-H292) mit einem Maximum nach 8 Stunden und einer Dauer von 24 Stunden macht. In Primärzellen fand sich das Maximum der Genexpression nach 48 Stunden und die Expression dauerte 72 Stunden an (35). In einem Meerschweinchen-Modell rief TNF- $\alpha$  sowohl konzentrations- als auch zeitabhängig eine erhöhte Mucin-Sekretion hervor. Die stärkste Reaktion wurde hierbei bei Konzentrationen von 10 bis 15 ng/ml und einer Inkubationszeit von 8 Stunden gefunden. Bei einer Erhöhung der Konzentration auf 100 ng/ml sank die Mucin-Sekretion wieder auf Baseline-Werte ab (21).

### 1.5.2 Lipopolysaccharid

Lipopolysaccharide (LPS) wurden erstmal 1944 isoliert und sind die Hauptkomponenten der Zellmembran fast aller gramnegativen Bakterien und sind starke Stimulatoren von Immunsystems und Entzündung. LPS kann morphologische Veränderungen von Becherzellen und in verschiedenen Mucosa-Arten auch eine Proliferation der Becherzellen hervorrufen (20; 52). Des Weiteren ruft LPS dosisabhängig eine erhöhte Sekretion von Atemwegsmucinen hervor mit einem Maximum bei 100 ng/ml (54). LPS führt in den ersten 24 Stunden nach Stimulation zu einem Anstieg des intrazellulären Mucins, aber eine gesteigerte Genexpression findet verzögert statt. Nach 48 Stunden waren sowohl das intrazelluläre Mucin als auch die Genexpression erhöht (30).

TLR-4 fungiert als ein Rezeptor für LPS. Die Bindung von LPS führt zur Rekrutierung und Aktivierung einer Reihe von Kinasen und endet in der Freisetzung des Transkriptionsfaktors NF-κB. NF-κB ist in der Lage, in den Zellkern zu translozieren und einen Anstieg der Genexpression inflammatorischer Zytokine zu induzieren (Abbildung 2).

Die TNF-alpha-Expression wird also über eine Aktivierung des TLR-4 reguliert (TLR-4 → MyD88 → NF kappa B → IL-8 Genexpression). Analog dieser Entzündungsreaktion wird die Mucin- Expression über eine Aktivierung des TLR-4 Rezeptors, MyD88 und anschließend den Weg der MAP- Kinase (TLR-4 → MyD88 → RAS → MEK 1/2 → ERK 1/2 → Sp1, AP1 → Mucin- Genexpression) reguliert (50) (Abbildung 2).



**Abbildung 2** • Schematische Darstellung der Signaltransduktion für die Mucin- und TNF-Regulation. Zellwandbestandteile von gramnegativen Bakterien wie *Pseudomonas aeruginosa* binden an spezifische Rezeptoren auf der Zellmembran (TLR-4), die direkt MAP-Kinase und NF-κB aktivieren und somit zur Expression von Mucinen und Zytokinen führen.

### 1.5.3 Lymphotoxin alpha

Lymphotoxin  $\alpha$  (LT- $\alpha$ ), alternativ auch Tumor Nekrose Faktor  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) genannt, ist ein dem TNF- $\alpha$  verwandtes Zytokin aus der Superfamilie der TNF-Proteine, das erstmals 1968 beschrieben wurde. Es ist ebenfalls ein Trimer, hat große Ähnlichkeit (insgesamt 30% identische Aminosäuren) und viele Gemeinsamkeiten mit TNF- $\alpha$  sowie einige dem TNF- $\alpha$  ähnliche Effekte (41). Es teilt sich mit TNF- $\alpha$  die Rezeptoren und wird von aktivierten Lymphozyten sezerniert. Eine weitere Rolle von LT- $\alpha$  ist, dass es als membrangebundenes Heterotrimer mit

Lymphotoxin  $\beta$  (LT- $\beta$ ) entscheidend ist für die Entwicklung und die Aufrechterhaltung von Lymphknoten, Peyer'schen Plaques und der Follikelstruktur der Milz (22) .

### **1.6 Infliximab**

Infliximab ist ein chimärer monoklonaler IgG-Antikörper, der zu 75% aus menschlichen, zu 25% aus murinen Sequenzen besteht. Er vermittelt seine Wirkung am ehesten über drei Mechanismen:

- a) Infliximab bindet lösliches TNF- $\alpha$  und neutralisiert seinen Effekt
- b) Infliximab bindet an membrangebundenes TNF- $\alpha$  und induziert eine komplementvermittelte und antikörperabhängige zytotoxische Zerstörung der TNF- $\alpha$ -exprimierenden Immunzelle
- c) Infliximab kann Apoptose bei T-Zellen und Monozyten induzieren (38).

Infliximab ist derzeit zugelassen für die Behandlung des M. Crohn, der durch Steroide und/oder Immunsuppressiva nicht zu beherrschen ist, für die Rheumatoide Arthritis, die nicht oder nur unzureichend auf die Basistherapie anspricht, für die Colitis ulcerosa, die nur unzureichend auf die konventionelle Therapie, einschließlich Kortikosteroide und 6-Mercaptopurin (6-MP) oder Azathioprin (AZA), anspricht, sowie für die Ankylosierende Spondylitis bei schwerer Wirbelsäulensymptomatik, erhöhten serologischen Entzündungsparametern und unzureichendem Ansprechen auf die konventionelle Therapie. Auch für die Psoriasis-Arthritis und die Psoriasis ist es bei unzureichendem Ansprechen auf die konventionelle Therapie oder Unverträglichkeit von Methotrexat zugelassen.

Infliximab ist auch wegen der teils gravierenden Nebenwirkungen ein Medikament, das nur als Reservemedikament bei Versagen oder unzureichendem Erfolg der konventionellen Therapie zum Einsatz kommt. Zu den als häufig beschriebenen Nebenwirkungen gehören Störungen des zentralen Nervensystems wie

Kopfschmerzen, Schwindel, Benommenheit ebenso wie Beschwerden im Gastrointestinaltrakt (Übelkeit, Diarrhoe, Abdominalschmerzen, Dyspepsie). Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass es mitverantwortlich sein könnte für das Auftreten eines sehr aggressiv und meist tödlich verlaufenden hepatosplenalen T-Zell-Lymphoms, besonders bei Heranwachsenden und jungen Erwachsenen mit M. Crohn.

## 2 Fragestellung

Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) ist eines der wichtigsten bekannten pro-inflammatorischen Zytokine. TNF- $\alpha$  wurde als wichtiger Faktor in der Pathogenese einer Reihe entzündlicher Erkrankungen beschrieben, u.a. rheumatoide Arthritis, entzündliche Darmerkrankungen und chronisch entzündliche Lungenerkrankungen, darunter chronische Bronchitis, zystische Fibrose und chronisch seröse Otitis media. Infliximab, der monoklonale Antikörper gegen TNF- $\alpha$ , wird in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis, des M. Crohn und der Colitis ulcerosa eingesetzt. In den Atemwegen erhöht TNF- $\alpha$  die Mucin-Biosynthese, indem es die MUC5AC-mRNA-Level erhöht. TNF- $\alpha$  stabilisiert darüber hinaus das mRNA-Transkript und trägt damit zu einer erhöhten MUC5AC-mRNA-Konzentration in der humanen Lungenkrebs-Zelllinie NCI-H292 bei. Exogen appliziertes rhTNF- $\alpha$  stimuliert Muzinsekretion in Tracheal-Epithelzellen von Meerschweinchen (GPTEC) in Primärkultur, wobei ein maximaler Effekt bei TNF- $\alpha$ -Konzentrationen von 10 bis 20 ng/ml zu sehen ist. In diesen GPTEC stimuliert TNF- $\alpha$  die Muzinsekretion über einen Mechanismus, der von der Phosphokinase C (PKC) abhängt und die Aktivierung einer Stickstoffoxid-Synthase mit der Entstehung von Stickstoffoxid und der Produktion von zyklischem GMP (cGMP) beinhaltet (21). Ähnliche Steigerungen der Mucin-Sekretion und MUC2-Genexpression wurden in humanen Atemwegs-Organkulturen gezeigt, die mit rhTNF- $\alpha$  (20 ng/ml) stimuliert wurden (35). MUC5B ist eine Hauptkomponente der Mittelohrsekretionen bei chronischer Otitis media mit Erguß (42). TNF- $\alpha$  stimuliert MUC5AC-Mucin-Sekretion in humanen Atemwegsepithelkulturen dosisabhängig mit einer maximalen Stimulation bei 20 ng/ml nach 7 Stunden. Präkonfluente Zellen reagieren mit der doppelten Mucin-Sekretion. Das kann daran liegen, dass konfluente Zellen nur apikal dem TNF- $\alpha$  ausgesetzt sind, während präkonfluente Zellen auch von basolateral mit TNF- $\alpha$  in Kontakt kommen (53).

Ziel dieser Studie war es herauszufinden, ob in einem Air/Liquid-Interface-Modell mit den humanen Atemwegsepithelzelllinien 16HBE14o-, 1HAEO- und NCI-H292 eine durch TNF- $\alpha$  stimulierte Mucin-Hypersekretion mit Infliximab, einem humanen



rekombinanten Antikörper gegen TNF- $\alpha$ , gehemmt werden kann. Ein weiteres Ziel war es in diesem Fall zu zeigen, ob bei einer Stimulation von basal eine Hemmung von apikal möglich ist, wie es bei einer topischen Anwendung von Infliximab in entzündeten Atemwegen der Fall wäre.

### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Zelllinien und Zellkultur**

##### **3.1.1 Zelllinien**

###### **3.1.1.1 16HBE14o-**

Die humane Atemwegs-Zelllinie 16HBE14o- war eine Gabe von Dr. D. Gruenert (California Pacific Medical Center Research Institute, University of California, San Francisco, USA) an Dr. Markus Henke. Sie wurde initial entwickelt, um CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) zu untersuchen und besitzt noch viele Eigenschaften eines differenzierten Bronchialepithels. Sie ist durch SV40 T-Antigen immortalisiert (13). Sowohl für 16HBE14o- als auch für 1HAEO- konnte u.a. gezeigt werden, dass sie Lectin auf die gleiche Weise binden wie Basalzellen und somit ein gutes Modell für die Untersuchung der basalen Zellfunktionen von Atemwegsepithelien *in vitro* darstellen (18). 16HBE14o-Zellen wurden bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> subkultiviert.

###### **3.1.1.2 1HAEO-**

Auch die humane Atemwegs-Zelllinie 1HAEO- ist mit SV40 T-Antigen transformiert (13) und war ebenfalls eine Gabe von Dr. D. Gruenert (California Pacific Medical Center Research Institute, University of California, San Francisco, USA) an Dr. Markus Henke und wurde bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> subkultiviert.

###### **3.1.1.3 NCI-H292**

Die Zelllinie NCI-H292 ist eine Mucoepidermoid-Karzinom-Zelllinie, die Mucine produziert und als Modell-System für die Atemwege verwendet wird (5). Sie wurde in RPMI-1640-Medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) bei 37°C in einem befeuchteten Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub> subkultiviert.

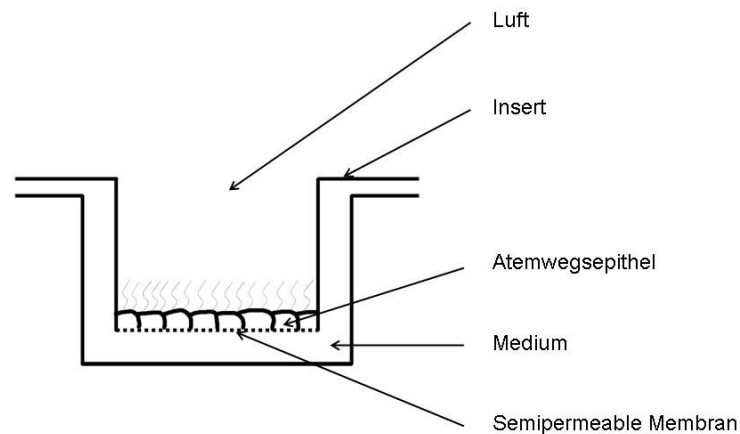
### 3.1.2 Zellkultur

#### 3.1.2.1 Air/Liquid Interface (ALI)

Das Air/Liquid Interface (ALI) ist ein spezielles Zellkultursystem, in dem Zellen auf einer permeablen Membran angezüchtet werden können (Abbildung 3). Epithelzellen und andere Zellarten können so polarisiert herangezüchtet werden und somit unter natürlicheren Bedingungen untersucht werden. Zudem kommt es zu einer höheren Differenzierung der Zellen, wodurch sie *in vitro* morphologisch und funktionell eher die Situation *in vivo* widerspiegeln. Mit Hilfe dieses Systems können auch bestimmte Zellfunktionen wie Transport, Adsorption und Sekretion sehr gut untersucht werden, da es bequemen Zugang sowohl zur basalen wie zur apikalen Domäne bietet.

Erstmals beschrieben wurde dieses System als Whitcutt-Kammer 1988, wobei Atemwegsepithelien von Meerschweinchen angezüchtet wurden (60). Yamaya et. al konnten 1992 zeigen, dass Ionen-Transporteigenschaften und Struktur der Zellen in ALI besser sind als bei Eintauch-Kulturen (63).

Es wurden 6-Well-Platten (Costar, Cambridge, MA) verwendet, um einen möglichst großen Durchmesser und damit eine größere Mucin-Ausbeute zu erhalten und das Herunterwaschen der Zellsekretionen zu erleichtern.



**Abbildung 3 •** Air/Liquid Interface Zellkultursystem (ALI). Zellkulturen humaner Atemwegsepithelien werden auf eine mit Kollagen vorbeschichtete semipermeable Membran aufgebracht und nach Konfluenz nur noch von basolateral mit Medium versorgt. Die Ausdifferenzierung erfolgt innerhalb 2 – 3 Wochen

Die humanen Atemwegs-Zelllinien 16HBE14o- und 1HAEo- wurden in MEM (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) kultiviert, das 10% FCS (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 5% L-Glutamin (PAA Laboratories, Pasching, Austria) und 5% Penicillin-Streptomycin (PAA Laboratories, Pasching, Austria) enthielt.

Zur Subkultivierung der Zellen wurden Kulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) benutzt, die 1h bei 37°C mit 2ml Typ I Rinder-Kollagen (3,15 mg/ml, Becton Dickinson, Mountain View, CA) in 100 ml LHC Basalmedium (Biosource, Rockwell, MD, USA) vorbeschichtet waren. Das Medium wurde jeden zweiten Tag gewechselt. Bei etwa 90% Konfluenz wurden die Zellen mittels Trypsinierung (Trypsin, (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)) geerntet und mit einer Dichte von 0,1 bis 0,25 x 10<sup>6</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> auf 75-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Germany) zur weiteren Subkultivierung ausgesät.

Um die Mucin-Sekretion zu untersuchen, wurden die Zellen auf Air-Liquid-Interface (ALI) auf Transwell Zellkultur Inserts (Costar, Cambridge, MA) ausgesät (Abbildung 4). Das Medium wurde sowohl am Boden als auch auf den Inserts selbst jeden zweiten Tag gewechselt, bis die Zellen konfluent waren. Von diesem

Zeitpunkt an wurde das Medium auf den Zellen komplett entfernt, und die Zellen bekamen nun täglich Medium ausschließlich von basal. Um eine möglichst gute Ausdifferenzierung der Zellen zu gewährleisten und die Bedingungen in den Atemwegen zu simulieren, wurden die Zellen drei bis vier Wochen täglich von basal mit Medium versorgt.



**Abbildung 4 •** Ein mit Kollagen vorbeschichtetes Transwell Insert wird in eine 6-Well-Mikroplatte gegeben (Quelle: Corning Incorporated, Corning, New York, USA)

#### **3.1.2.2 Zellkulturmedien**

Es stehen verschiedene Zellkulturmedien zur Verfügung. Im Rahmen dieser Studie wurden für die Zelllinien 16HBE14o- und 1HAEO- die folgenden Medien verwendet:

1. MEM – Minimal Essential Medium mit Earle's Salzen mit L-Glutamin und 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin, Standard-Medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
2. DMEM – Dulbecco's Minimum Essential Medium (Modified Eagle's Medium) (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
3. F12 – Ham's F12-Medium (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)

4. BEGM – Bronchial Epithelial Growth Medium mit den Zusätzen und Wachstumsfaktoren BPE, Hydrocortison, hEGF, Epinephrin, Insulin, Trijodthyronin, Transferrin, Gentamycin/Amphotericin B sowie Retinsäure (Lonza/Cambrex, Basel, Switzerland)

Für die Zelllinie NCI-H292 wurde ausschließlich das Zellkulturmedium RPMI-1640 (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) mit den Zusätzen 10% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin verwendet.

Chemikalien/Geräte/Reagenzien	Hersteller
Zellinkubator	Heraeus, Kleinostheim, Germany
Sterilbank	Heraeus, Kleinostheim, Germany
Wasserbad	GFL, Burgwedel, Germany
Auflichtmikroskop	Hund, Wetzlar, Germany
Neubauer Zählkammer	Hausser Scientific, Horsham, PA, USA
Laborzentrifuge	Heraeus, Kleinostheim, Germany
Serologische Pipetten (2, 5, 10, 25 ml)	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany
Akku-Pipette	Eppendorf, Hamburg, Germany
Pasteur-Pipetten	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt, Germany
Gewebekulturflaschen (Größe 75 cm <sup>2</sup> )	Sarstedt, Nümbrecht, Germany
ALI-Gewebekulturschalen (6-Well) mit Einsätzen	Costar, Cambridge, MA
Fötale Kälberserum (fetal calf serum, FCS)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Trypsin (0,05%)/EDTA (0,53mM)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Penicillin (10.000 U/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	PAA Laboratories, Pasching, Austria
L-Glutamin	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Phosphat-gepufferte Saline (PBS, pH 7,4)	Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

**Tabelle 1 • Chemikalien, Geräte und Reagenzien in der Zellkultur**

### 3.1.3 Stimulation der Zellen

Zur Stimulation der Zellen wurde in erster Linie TNF- $\alpha$  (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) in verschiedenen Konzentrationen (5 – 20 ng/ml) eingesetzt. Die weiteren Stimulanzen – ebenfalls in verschiedenen Konzentrationen – waren LT- $\alpha$  (2 – 200 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) und LPS von *Pseudomonas aeruginosa* (100 – 400 ng/ml, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Die Stimulation erfolgte von basal im Zellkulturmedium

über 24 Stunden bis zu 15 Tagen. Im Falle von mehrtägigen Stimulationen wurde das Medium mit dem Stimulanz alle 24 Stunden gewechselt.

Im Rahmen der Optimierung des Versuchsaufbaus wurde das Medium mit und ohne Stimulation z.T. nur jeden zweiten Tag gewechselt oder unterschiedliche Mengen Medium verwendet (1 – 2 ml/Tag bzw. alle 2 Tage)

### **3.2 Proben-Vorbereitung**

Die Zellsekretionen wurden von den ALI-Kulturen durch zehnmaliges vorsichtiges Waschen mit Pufferlösung (PBS mit 1mM DTT, Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA und Sigma-Aldrich, München, Germany) gewonnen. Während des Waschvorgangs wurde die Pipettenspitze vor und zurück bewegt, um die gesamte Oberfläche der Zellen zu spülen.

### **3.3 Western Blot Analyse**

Die Zell-Sekretionen wurden in einen 4x-Laemmli-Probenpuffer gegeben (500 mM Tris pH 6.8 (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA); 8% SDS (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA); 40% Glycerol (Sigma-Aldrich, München, Germany ); 40 mM DTT (Sigma-Aldrich, München, Germany)) und in kommerziellen Tris-HCl-Gelen aufgetrennt (Criterion Precast Gel, 4-15%, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Die Proben wurden 5 Minuten bei 95°C denaturiert, bevor die Gele beladen wurden. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Gel-Apparatur bei konstanten 25mA pro Gel bei Raumtemperatur durchgeführt und gestoppt, wenn die Farbfront etwa 1 cm vor dem Ende des Gels lag. Nach der Elektrophorese wurden die Proteine mit elektrischem Transfer (30V, 18h bei 4°C) in Tris-Glycin-Puffer (20% Methanol) auf Nitrocellulose-Membranen (Whatman, Maidstone, Kent, UK) transferiert.

Die Membranen wurden mit Puffer (PBS (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10% fettarmes Milchpulver (Merck, Darmstadt, Germany)) für mindestens eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt und dann eine weitere Stunde mit den Primär-Antikörpern (Kaninchen-Antiserum LUM5-1 gegen das Peptid

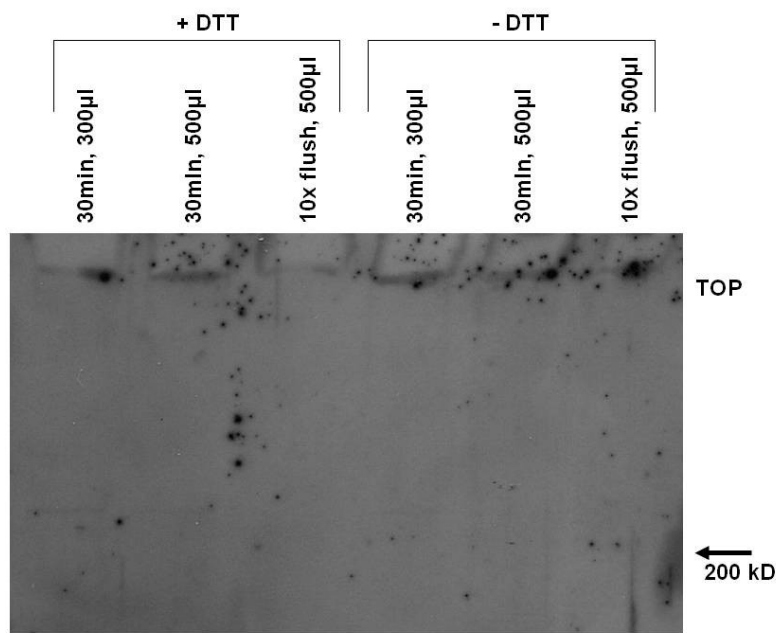
RNQDQQGPFKMC (56), Kaninchen-Antiserum LUM5B-2 gegen das Peptid RNREQVGKFKMC (62) in 1% Milchpulver in PBS inkubiert, 3 mal 10 Minuten mit PBS gewaschen und noch mal 1 Stunde mit einem mit Rettichperoxidase markierten Anti-Kaninchen-Sekundärantikörper (Pierce, Rockford, IL, USA) in 1% Milchpulver in PBS inkubiert. Schließlich wurden die Membranen wieder 3 mal 10 Minuten mit PBS gewaschen. Die Membranen wurden schließlich mit einem Pico- bzw. Femto-Entwickler-Kit von Pierce entwickelt und auf einem X-Omat Blue Film (Kodak, Rochester, NY, USA) dargestellt.

### **3.3.1 Antikörper**

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antikörper wurden bereits in früheren Veröffentlichungen eingesetzt (26; 27). Dazu wurden synthetische Peptide mit den Sequenzen RNQDQQGPFKMC (28), die im C-terminalen Anteil und in zwei Teilen nahe der Tandem-Wiederholungs-Sequenz des MUC5AC-Apoproteins zu finden ist, und RNREQVGKFKMC (62), die in der Cystein-reichen Domäne der Wiederholungssequenzen im zentralen Exon des MUC5B-Apoproteins liegt, an Keyhole Limpet Hämocyanin (KLH) konjugiert und in Kaninchen zur Herstellung von Antikörpern benutzt (Genemed Synthesis, San Francisco, CA, USA). Die Antikörper wurden charakterisiert, und die Spezifität wurde durch Präabsorptions-Studien mit steigenden Konzentrationen der Antigen-Peptide überprüft, wie es bereits für die originalen LUM5-1- und LUM5B-2-Antikörper beschrieben war (28; 62). Die Antiseren, die nach 4 Wochen gewonnen werden konnten, wurden mittels ELISA für die Peptide und mittels Western Blot für die Proteine, die Antikörper mittels einer Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf Spezifität überprüft (27).

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden zur Überprüfung der Spezifität Zellsekrete mit Prä-Immun-Serum der zur Herstellung der Antikörper verwendeten Kaninchen inkubiert. Hier zeigten sich keine Banden (Abbildung 5).





**Abbildung 5** • 16HBE14o-Zellen, d21 ALI, MEM, Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  für 24, Präimmun-Antikörper. Man sieht anders als bei den Seren nach Immunisierung keine Banden.

Chemikalien/Geräte/Reagenzien	Hersteller
Tischzentrifuge	Heraeus, Kleinostheim, Germany
Reaktionsgefäße	Heraeus, Kleinostheim, Germany
Schüttler	Heidolph Instruments, Schwabach, Germany
Gelkammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Polyacrylamid-Gele, 4-15%	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Tris-Glycin-Puffer, pH 8,3	Medicago, Québec, Canada
Sodiumdodecylsulfat (SDS) 10% (w/v)	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Probenpuffer, 4x	Roth, Karlsruhe, Germany
Protein-Standard	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Power Supply	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Transferkammer	Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA
Nitrocellulose Transfer Membran, Porengröße 0,2 µm	Whatman, Maidstone, Kent, UK
Filterpapier	Schleicher & Schuell/Whatman, Maidstone, Kent, UK
Methanol, p.a.	Sigma-Aldrich, München, Germany
Milchpulver	Merck, Darmstadt, Germany
Sekundärantikörper, HRP-konjugiert, anti-rabbit	Pierce, Rockford, IL, USA
SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate	Pierce, Rockford, IL, USA
Röntgenfilm	Kodak, Rochester, NY, USA
Entwicklermaschine	MS Laborgeräte, Wiesloch, Germany

**Tabelle 2 • Chemikalien, Geräte und Reagenzien beim Western Blot**

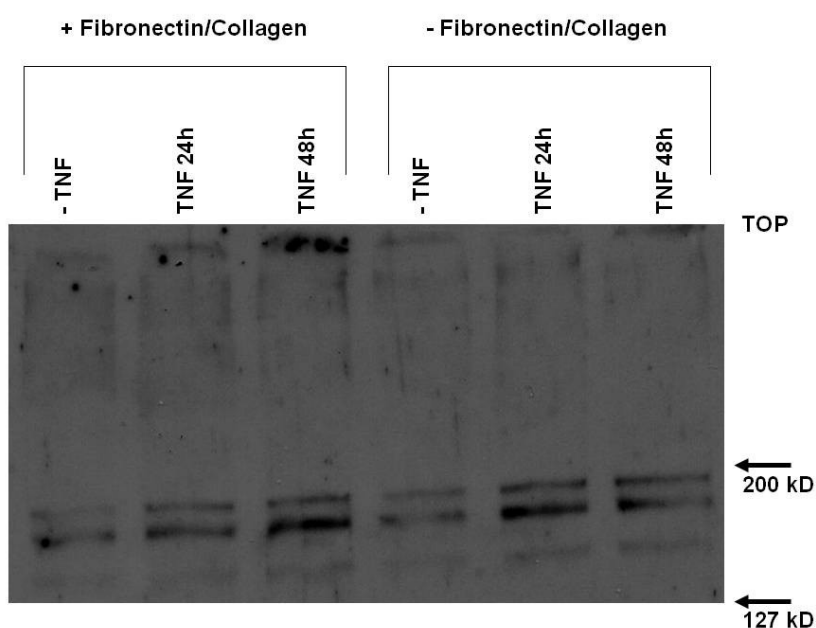
## **4 Ergebnisse**

### **4.1 Optimierung des Versuchsaufbaus**

#### **4.1.1 Vorbereitung der Wells**

Ebenso wie die Zellkulturflaschen kann man die 6-Well-ALI-Platten mit Fibronectin/Kollagen vorbeschichten, um eine bessere Haftung der Zellen zu erreichen (13), oder sogar bereits industriell mit Kollagen vorbeschichtete Inserts kaufen. Ein erster Schritt zur Optimierung des Versuchsaufbaus war es, die Mucin-Sekretion von Zellen zu untersuchen, die auf kollagen- und fibronectinfreien sowie kollagen- und fibronectinbeschichteten Inserts gezüchtet wurden. Hierzu wurde zunächst eine Konzentration von 10 ng/ml TNF- $\alpha$  zur Stimulation verwendet.

Hierbei zeigte sich, dass es keinen wesentlichen Unterschied auf die Mucin-Sekretion hat, ob die Platten mit Fibronectin/Kollagen vorbeschichtet sind (Abbildung 6). Weiterhin kann man bereits erkennen, dass es durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  zu einer erhöhten Mucin-Sekretion kommt.



**Abbildung 6 •** 16HBE14o-Zellen, d24 ALI, BEGM, Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  für 24/48 Stunden, MUC5B-Antikörper. Man sieht, dass nach Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine Mucin-Sekretion stattfindet, dass es aber keinen Unterschied macht, ob die Wells vorbeschichtet sind

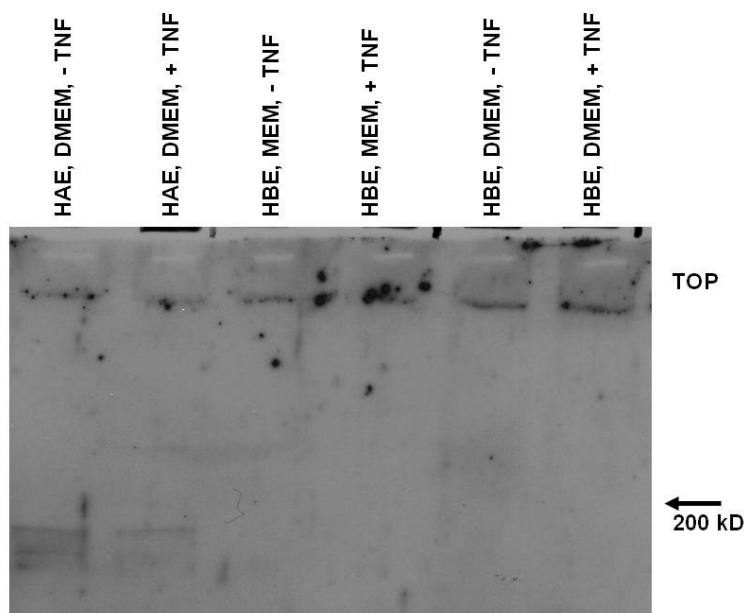
#### 4.1.2 Verschiedene Zellkulturmedien

Es gibt auf dem Markt unterschiedliche Zellkulturmedien, mit denen man Zelllinien versorgen kann (13). Zur weiteren Optimierung des Versuchsaufbaus wurden zur Versorgung und Stimulierung der Zellen die Medien MEM (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), DMEM (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), BEGM (Lonza/Cambrex, Basel, Switzerland) und F12 (Gibco, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) verwendet.

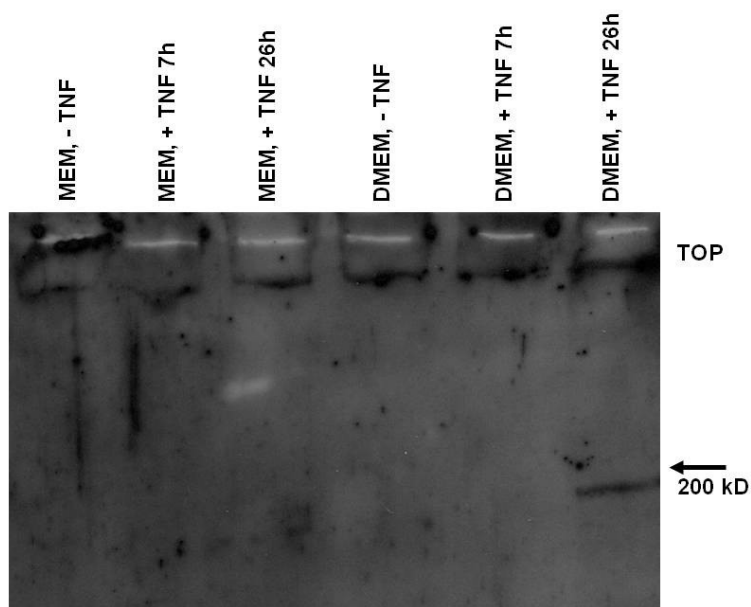
Weiterhin ist es möglich, die Zellen in einer 6-Well-ALI-Platte entweder täglich oder nur jeden zweiten Tag mit 1ml oder 2ml Zellkulturmedium pro Well zu versorgen (Abbildung 11, Abbildung 12).

Mehrere Versuchsreihen zeigten einen deutlichen Unterschied in der Mucin-Sekretion bei verschiedenen Medien unter sonst gleichen Bedingungen (Abbildung 7, Abbildung 8, Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11, Abbildung 12).

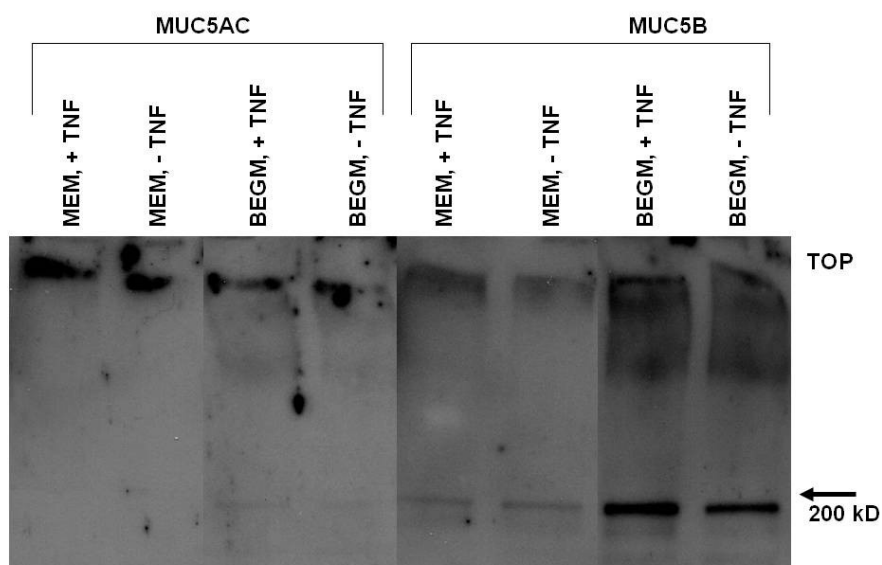
Es stellte sich heraus, dass es keinen nachweisbaren Unterschied zwischen MEM und DMEM gibt (Abbildung 7, Abbildung 8). Die Zellsekretionen der mit BEGM versorgten Zellen zeigten deutlich stärkere Banden als die beiden vorgenannten und auch als die der Zellen, die mit F12-Medium versorgt wurden (Abbildung 9, Abbildung 10, Abbildung 11). Außerdem erzielt man bessere Ergebnisse, wenn man die Zellen täglich mit 2ml Medium füttert (Abbildung 11, Abbildung 12).



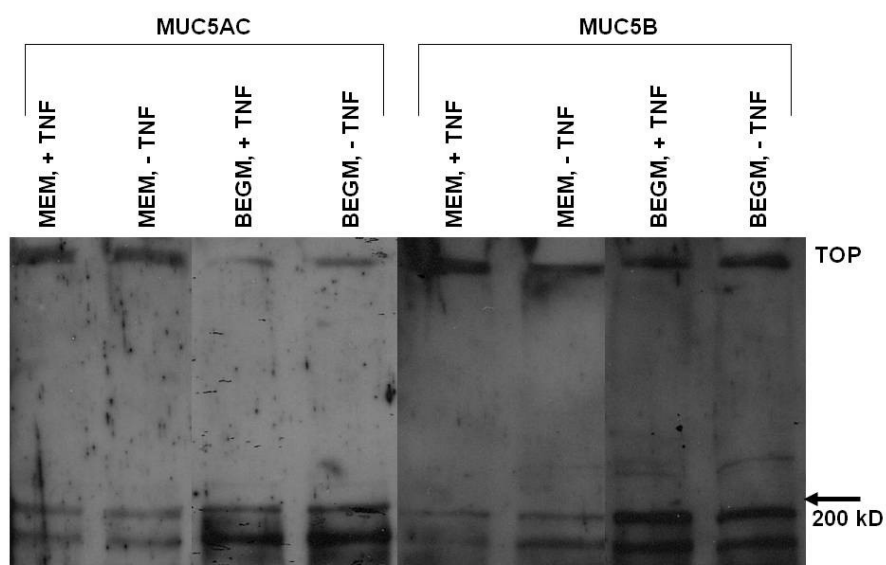
**Abbildung 7** • 1HAEo- und 16HBE14o-Zellen; d18 ALI; MEM und DMEM; Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  für 7h; MUC5AC-Antikörper. Kein Unterschied zwischen den mit MEM und DMEM gefütterten Zellen.



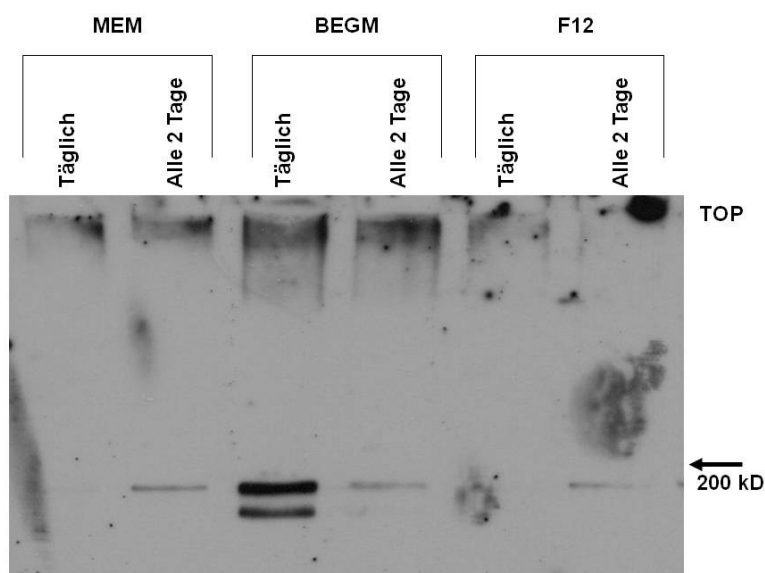
**Abbildung 8** • 16HBE14o-Zellen; d18 ALI; MEM und DMEM; Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  für 7/26h; MUC5B-Antikörper. Kein Unterschied zwischen den mit MEM und DMEM gefütterten Zellen.



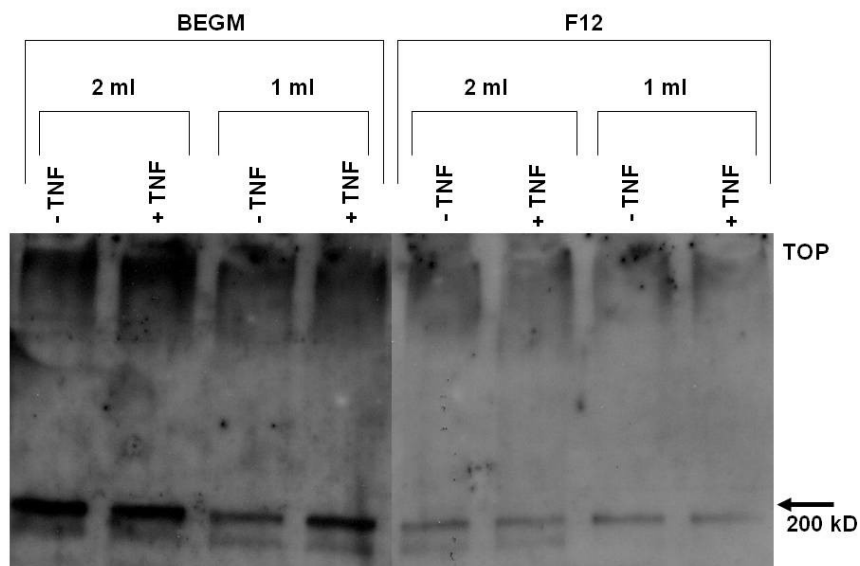
**Abbildung 9** • 16HBE14o-Zellen; d21 ALI; MEM und BEGM; Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  für 24h; MUC5AC- und MUC5B-Antikörper. Bessere Ergebnisse bei BEGM, insbesondere für MUC5B.



**Abbildung 10** • 1HAEo-Zellen; d21 ALI; MEM und BEGM; Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  für 24h; MUC5AC- und MUC5B-Antikörper. Stärkere Banden bei BEGM.



**Abbildung 11** • 16HBE14o-Zellen; d25 ALI; MEM, BEGM und F12, keine Stimulation mit TNF- $\alpha$ ; Fütterung der Zellen täglich/alle 2 Tage; MUC5B-Antikörper. Tägliche Fütterung mit BEGM zeigt das deutlichste Ergebnis.



**Abbildung 12** • 16HBE14o-Zellen; d22 ALI; BEGM und F12; Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  für 24h; MUC5B-Antikörper. Die besten Ergebnisse bei 2ml BEGM.



### 4.1.3 Gewinnung der Proben

Da für die vorliegende Arbeit mit Hilfe des Western Blots untersucht werden sollte, ob in einem Air/Liquid-Interface die Mucin-Sekretion nach apikal durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  im Medium (d.h. von basal) erhöht werden kann, wurden verschiedene Möglichkeiten der Probengewinnung von der apikalen Zelloberfläche untersucht.

Zum Herunterwaschen der Zellsekrete von der apikalen Oberfläche kann man nicht nur unterschiedliche Mengen Pufferlösung (Phosphate buffered saline – PBS) verwenden, sondern auch PBS mit oder ohne Dithiothreitol (DTT). DTT soll hier die stabilisierenden Disulfidbrücken reduziert. Weiterhin kann man die Zellsekrete direkt nach Auftragen des Puffers gewinnen oder erst nach 30 Minuten Inkubationszeit im Brutschrank.

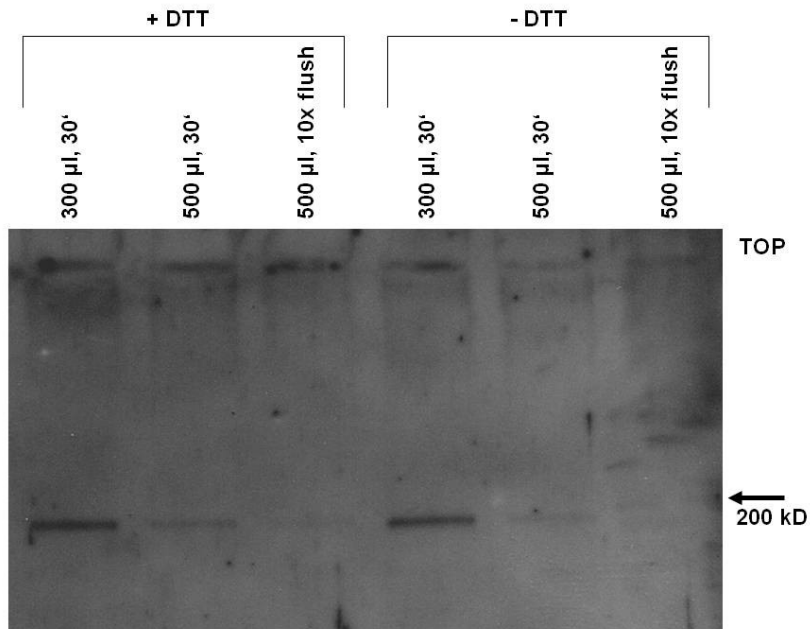
So erhält man stärkere Banden im Western Blot, wenn man für die Probengewinnung 300 $\mu$ l und nicht 500 $\mu$ l verwendet (Abbildung 13). Weiterhin scheinen die Banden geringfügig stärker, wenn man zur Gewinnung der Proben PBS mit 1mM DTT verwendet als PBS ohne DTT. Des Weiteren sollte man die Pufferlösung auf die Zelloberfläche geben und vor dem Herunterwaschen der Sekretion 30 Minuten im Brutschrank inkubieren (Abbildung 13).

Ein Zentrifugieren der Proben vor Beginn des Western Blot ergab keinen Unterschied (Abbildung 14).

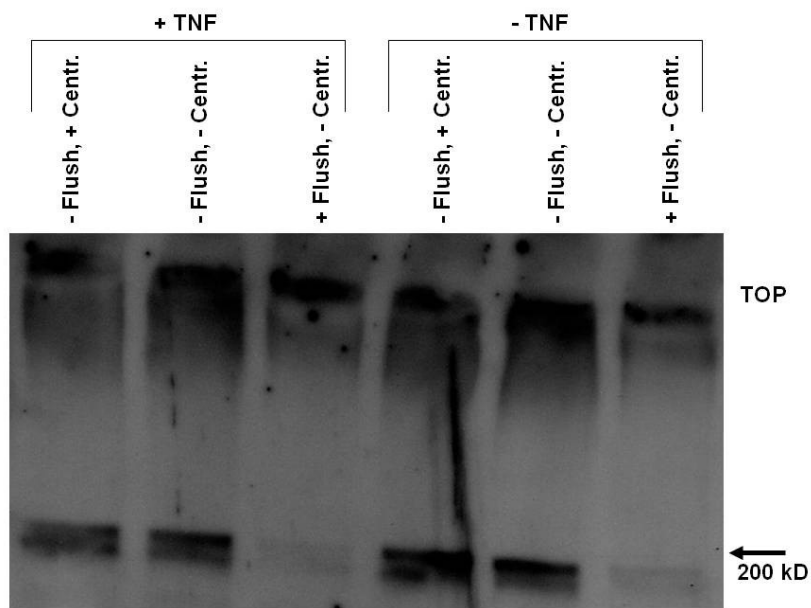
Da die Zellen längere Zeit gezüchtet wurden, um eine bestmögliche Ausdifferenzierung zu erreichen, muss man davon ausgehen, dass es während dieser Zeit bereits zu einer apikalen Mucin-Sekretion kommt. Um also ausschließlich die Mucin-Sekretion während der Versuchphase untersuchen zu können, ist es erforderlich, die basale Mucin-Sekretion der Wachstumszeit vor Versuchsbeginn herunterzuwaschen (Abbildung 14).

Für alle weiteren Versuche wurden die Zellen täglich mit 2ml BEGM-Zellkultur-Medium versorgt, die Oberfläche vor Versuchsbeginn mit PBS gewaschen, zur Probengewinnung 300 $\mu$ l PBS mit 1mM DTT verwendet und die Zellen mit der

Pufferlösung vor dem Herunterwaschen der apikalen Zellsekrete 30 Minuten inkubiert.



**Abbildung 13** • 1HAEO-Zellen; d21 ALI; MEM; Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$ ; MUC5B-Antikörper. Bessere Ergebnisse mit DTT und 300µl besser als 500µl.



**Abbildung 14** • 16HBE14o-Zellen; d29 ALI; BEGM; Stimulation mit 10ng/ml TNF- $\alpha$  für 24 Stunden; MUC5B-Antikörper; zehnmaliges Flushen der Zelloberfläche, Zentrifugieren der Probe nach Entnahme. Waschen vor Versuchsbeginn reinigt die Oberfläche, Zentrifugieren macht keinen Unterschied

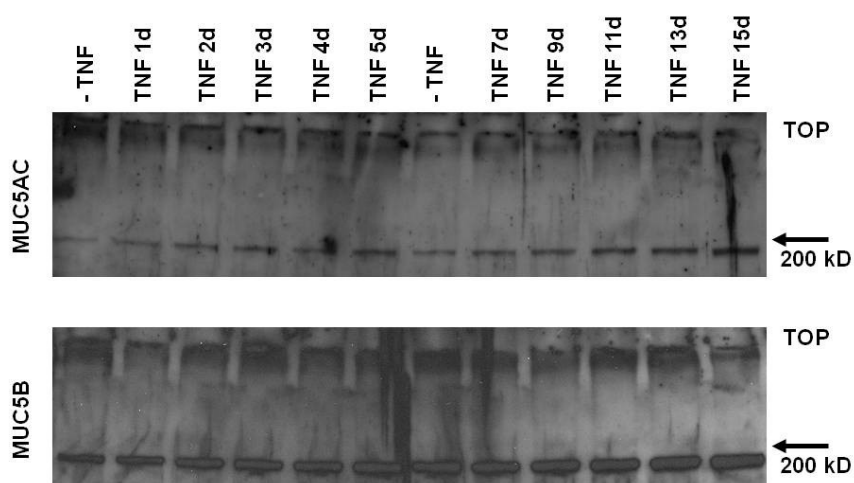
## 4.2 Stimulation der Mucin-Sekretion durch TNF-alpha

Dass die Mucin-Sekretion von Atemwegsepithelien durch TNF- $\alpha$  stimuliert werden kann, wurde bereits in verschiedenen Veröffentlichungen gezeigt (2; 21; 35; 53), auch wenn Borchers et al. beschreiben, dass es auf Stimulation mit TNF- $\alpha$  hin nicht zu einer Erhöhung der mRNA-Level für MUC5B kommt (7). Ein Maximum der Mucin-Sekretion wurde z.T. bei 10 – 15 ng TNF- $\alpha$  pro ml beschrieben (21), andere Autoren wiesen ein Maximum bei 20 ng/ml nach (35; 53).

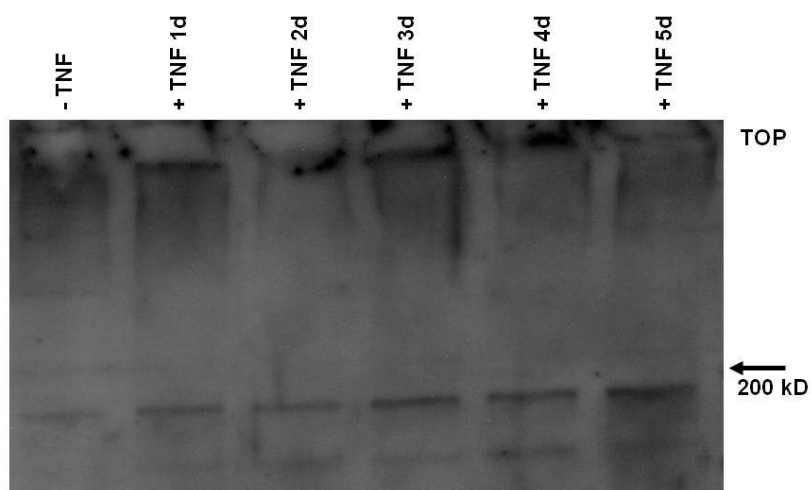
Zunächst wurde also untersucht, ob TNF- $\alpha$  eine Mucin-Sekretion in den verwendeten humanen Atemwegsepithelzellen hervorrufen kann. Hier konnte gezeigt werden, dass sowohl bei 1HAEO-Zellen als auch bei 16HBE14o-Zellen die Mucin-Sekretion durch Stimulation mit TNF- $\alpha$  gesteigert wird (Abbildung 15, Abbildung 22).

Des Weiteren wurden für die vorliegende Arbeit nicht nur unterschiedliche Konzentrationen untersucht (10 – 20 ng/ml TNF- $\alpha$ ), sondern auch eine länger andauernde Stimulation (bis zu 15 Tage). Diese lange Stimulation wurde erreicht, indem alle apikalen Zelloberflächen zu Versuchsbeginn mit PBS abgewaschen wurden und anschließend täglich für eine vorgegebene Anzahl von Tagen entweder mit reinem Zellkultur-Medium oder mit Medium mit Zusatz von TNF- $\alpha$  versorgt wurden. Bei Beendigung des Versuchs wurden alle Zellsekrete wie unter 4.1.3 beschrieben gewonnen.

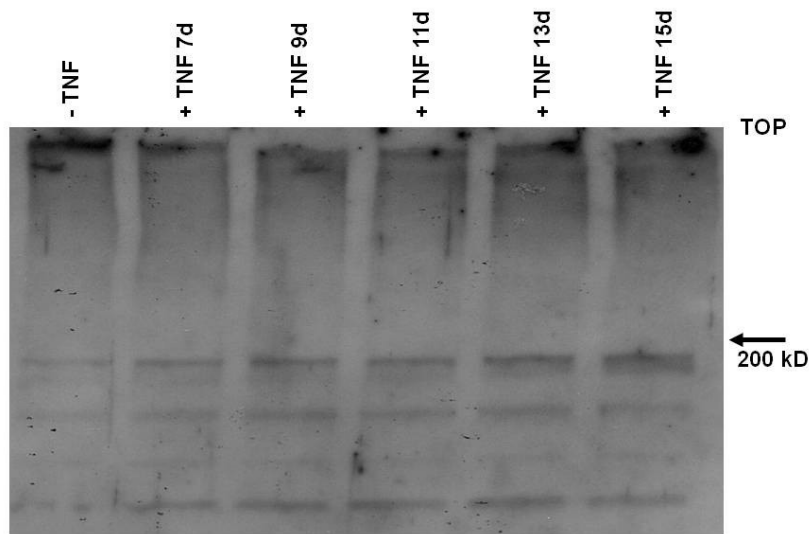
Hier zeigten sich stärkere Banden bei Stimulierung über mehrere Tage als nur über 24 Stunden (Abbildung 15). Auch die Stimulierung mit höheren Konzentrationen TNF- $\alpha$  zeigte eine stärkere Mucin-Sekretion (Abbildung 18). Für alle weiteren Versuche wurde also eine TNF- $\alpha$ -Konzentration von 20 ng/ml verwendet und die Zellen möglichst lange mit TNF- $\alpha$  stimuliert.



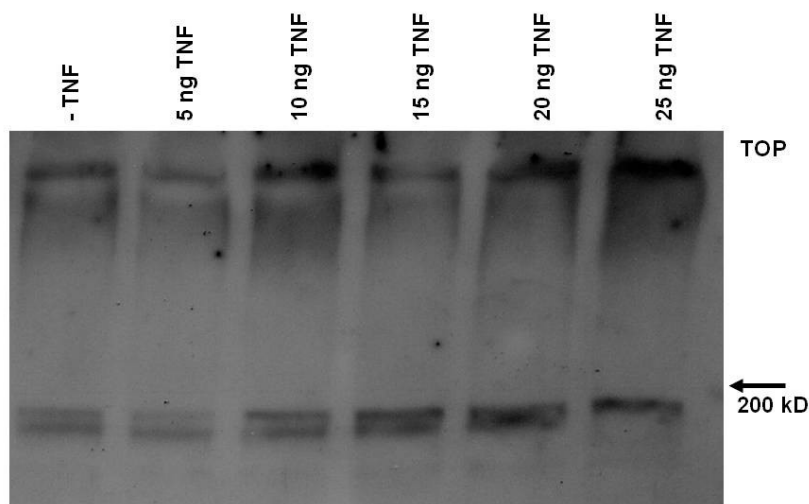
**Abbildung 15** • 16HBE14o-Zellen; d30 ALI; MEM; Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1 – 15 Tage; MUC5AC- und MUC5B-Antikörper. Höhere Mucin-Sekretion bei längerer Stimulation mit TNF- $\alpha$



**Abbildung 16** • 16HBE14o-Zellen; d33 ALI; BEGM; MUC5B-Antikörper; Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$ , 1 – 5 Tage; MUC5B-Antikörper. Höhere Mucin-Sekretion bei längerer Stimulation mit TNF- $\alpha$



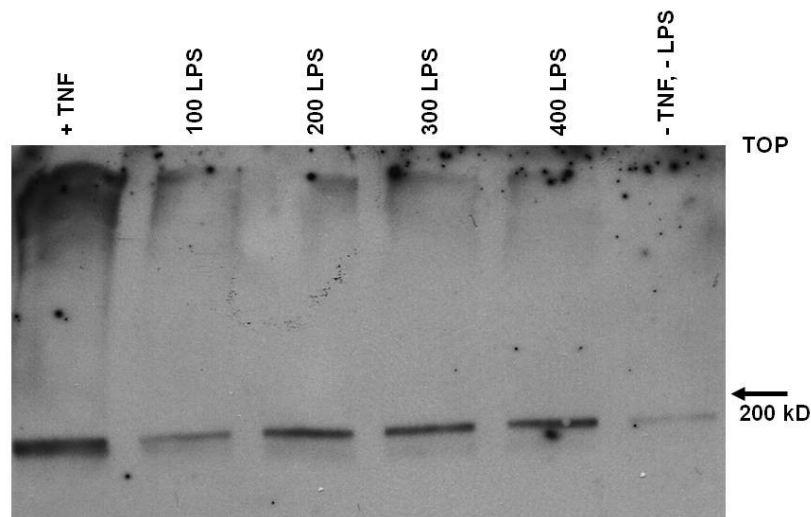
**Abbildung 17** • 16HBE14o-Zellen; d33 ALI; BEGM; MUC5AC-Antikörper; Stimulation mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$ ; 7, 9, 11, 13 und 15 Tage; Höhere Mucin-Sekretion bei längerer Stimulation mit TNF- $\alpha$



**Abbildung 18**• 16HBE14o-Zellen; d29 ALI; BEGM; MUC5B-Antikörper; Stimulation mit 0/5/10/15/20/25 ng/ml TNF- $\alpha$ ; Höhere Mucin-Sekretion bei höheren TNF- $\alpha$ -Konzentrationen

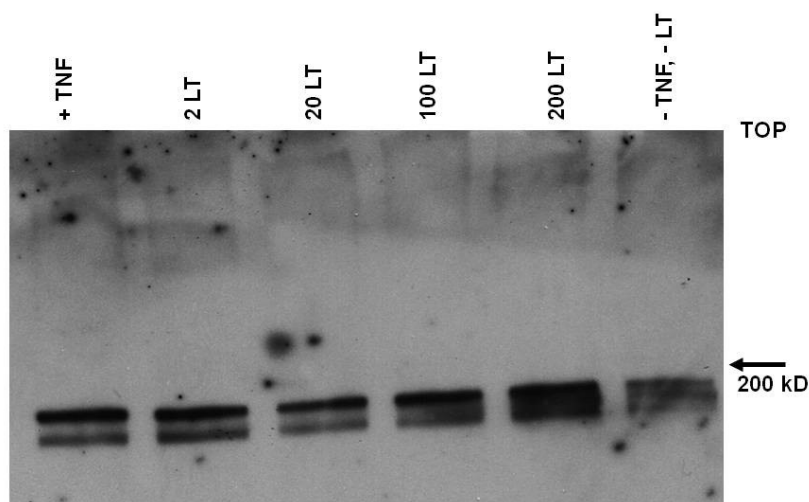
### 4.3 Stimulierung der Mucin-Sekretion durch andere Faktoren

Die Mucin-Sekretion in Atemwegsepithelien kann auch durch andere Faktoren stimuliert werden (7; 41). So kann z.B. Lipopolysaccharid, ein Produkt der bakteriellen Zellwand, die Sekretion von Mucinen anregen (54). Auch hier wurden zunächst unterschiedliche Dosierungen von Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* zur Stimulierung verwendet und mit der durch TNF- $\alpha$ -induzierten Mucin-Sekretion (20ng/ml) verglichen. Dabei zeigte sich, dass TNF- $\alpha$  insgesamt potenter ist als das bakterielle Produkt, das ein Maximum bei 200 – 400 ng/ml aufwies.



**Abbildung 19** • 16HBE14o-Zellen; d35 ALI; BEGM; MUC5AC-Antikörper; Stimulation mit 20 ng/ml TNF- $\alpha$  und 100 – 400 ng/ml LPS (*Pseudomonas aeruginosa*). Bei Stimulation mit TNF- $\alpha$  stärkere Mucin-Sekretion als bei Stimulation mit LPS, etwa gleiche Sekretion bei 200 – 400 ng/ml LPS

Auch Lymphotoxin  $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) – auch bekannt als Tumor Nekrose Faktor  $\beta$  (TNF- $\beta$ ) – stimuliert die Mucin-Sekretion von Atemwegsepithelien. Ähnlich wie bei Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* wurde die durch verschiedene Konzentrationen von LT- $\alpha$  hervorgerufene Mucin-Sekretion mit der durch TNF- $\alpha$  induzierten verglichen. In Abbildung 20 ist zu sehen, dass LT- $\alpha$  die Mucin-Sekretion in etwa gleichem Maße wie 20 ng/ml TNF- $\alpha$  bei 2 – 20 ng/ml und mehr als TNF- $\alpha$  bei 100 – 200 ng/ml stimuliert.



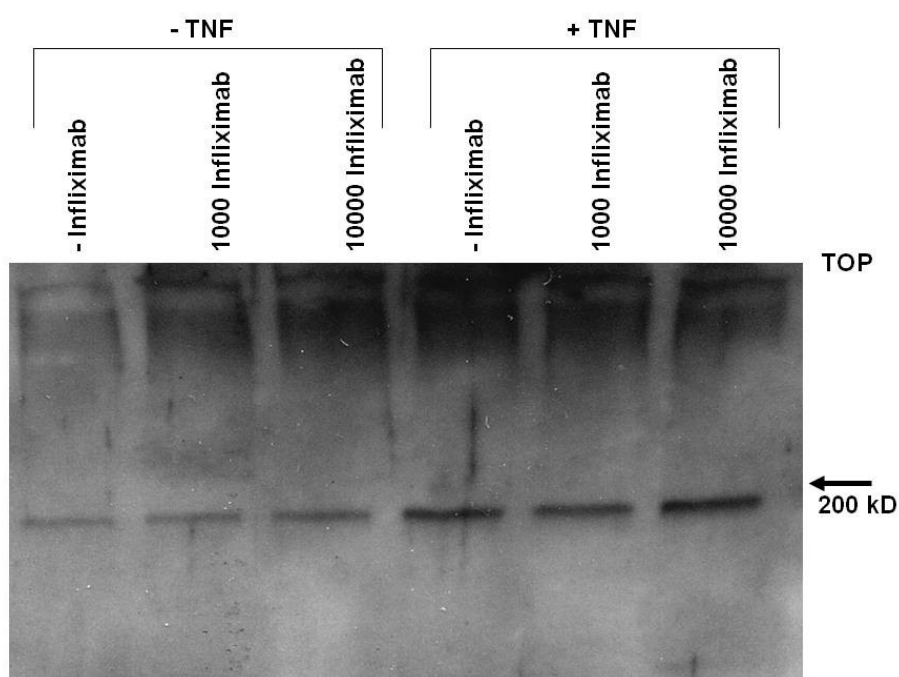
**Abbildung 20** • 16HBE14o-Zellen; d32 ALI; BEGM; MUC5AC-Antikörper; Stimulation mit 20 ng/ml TNF- $\alpha$  und 2 – 200 ng/ml LT- $\alpha$ . Bei Stimulation mit TNF- $\alpha$  etwa gleich starke Mucin-Sekretion wie bei 2 – 20 ng/ml LT- $\alpha$ , stärkere Mucin-Sekretion bei 100 – 200 ng/ml LT- $\alpha$



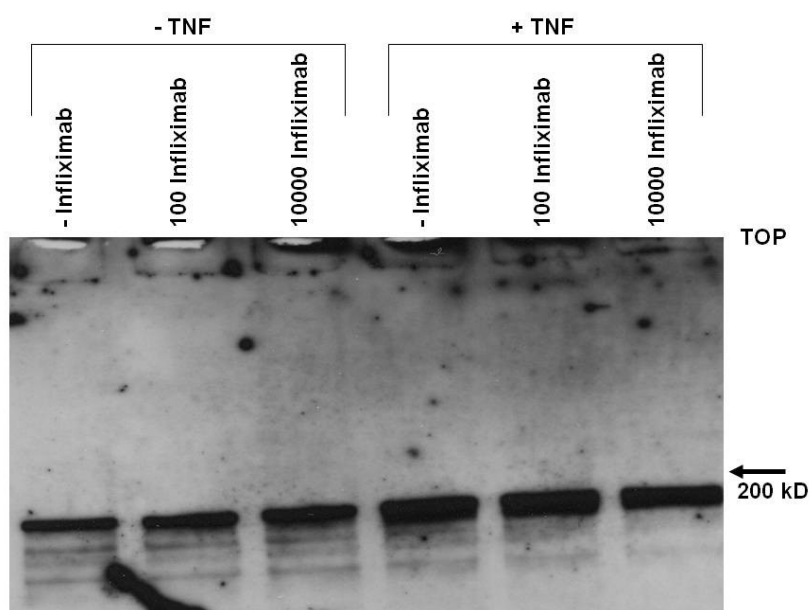
#### 4.4 Hemmung der Mucin-Sekretion mit Infliximab

##### 4.4.1 Hemmung bei Stimulation mit TNF-alpha

Nachdem die oben beschriebenen Zellversuche gezeigt haben, dass die Mucin-Sekretion von Atemwegsepithelien durch TNF- $\alpha$  stimuliert wird, ist es nicht verwunderlich, dass die so hervorgerufene Hypersekretion bei einer Gabe von TNF- $\alpha$  und Infliximab zusammen im Medium durch den Antikörper gehemmt werden kann (Abbildung 21, Abbildung 22). Hierbei wurde zunächst sowohl das TNF- $\alpha$  als auch das Infliximab von basal zugeführt.



**Abbildung 21** • 16HBE14o-Zellen; d41 ALI; BEGM; MUC5B-Antikörper; Stimulation über 2 Tage von basal mit 20 ng/ml TNF- $\alpha$  und Hemmung von basal mit 1000 und 10000 pg/ml Infliximab. Etwas geringere Mucin-Sekretion bei Hemmung mit 1000 pg/ml Infliximab, bei 10000 pg/ml gesteigerte Mucin-Sekretion

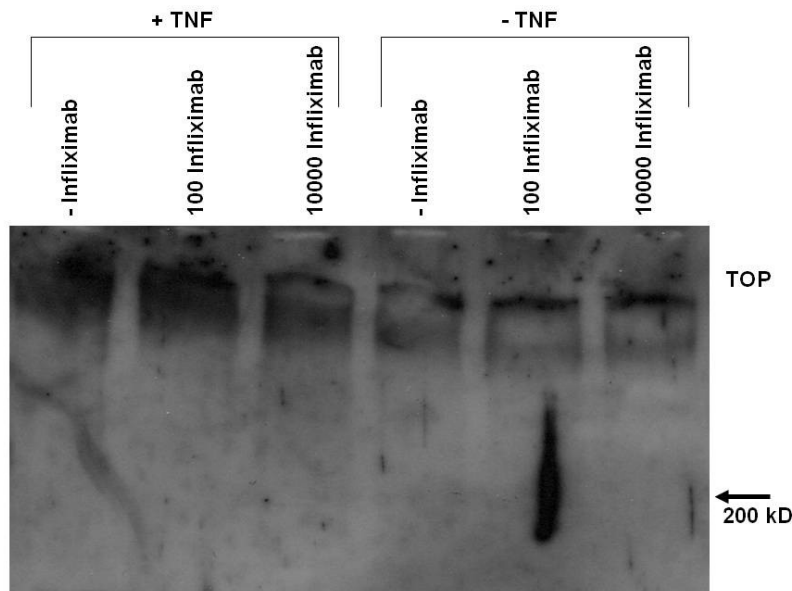


**Abbildung 22** • 1HAEo-Zellen; d29 ALI; BEGM; MUC5B-Antikörper; Stimulation über 24 Stunden von basal mit 20 ng/ml TNF- $\alpha$  und Hemmung von basal mit 100 und 10000 pg/ml Infliximab. Bei Stimulation mit TNF- $\alpha$  geringere Mucin-Sekretion bei gleichzeitiger Hemmung mit Infliximab; ohne Stimulation stärkere Mucin-Sekretion bei Gabe von Infliximab

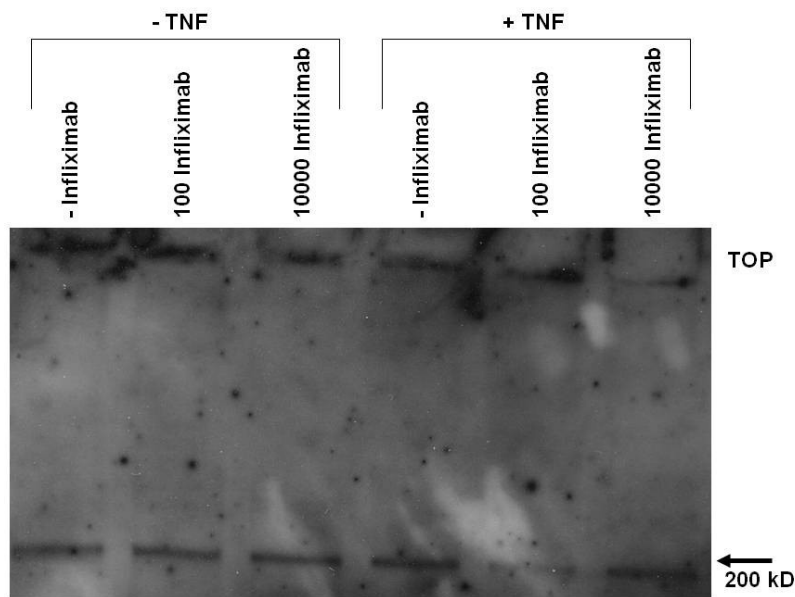
Hierbei zeigten sich allerdings auch stärkere Banden in den Zellsekreten, die nicht mit TNF- $\alpha$  stimuliert aber mit Infliximab gehemmt wurden (Abbildung 21, Abbildung 22).

Schließlich wurde noch bei Stimulation der Zellen von basal eine Hemmung mit Infliximab in verschiedenen Konzentrationen von apikal durchgeführt. Da hier allerdings die Gabe von Infliximab in 300  $\mu$ l PBS erfolgte, um die gesamte Oberfläche des Wells zu benetzen, war es versuchsbedingt nicht möglich, über einen Zeitraum von 15 Tagen zu stimulieren/hemmen.

Aber auch bei einer kürzeren Stimulation von basal und Hemmung von apikal (24 Stunden) deutete sich an, dass bei Stimulation der Mucin-Sekretion mit TNF- $\alpha$  von basal, d.h. im Medium, auch eine Hemmung mit Infliximab von apikal möglich zu sein scheint (Abbildung 23, Abbildung 24, Abbildung 27).



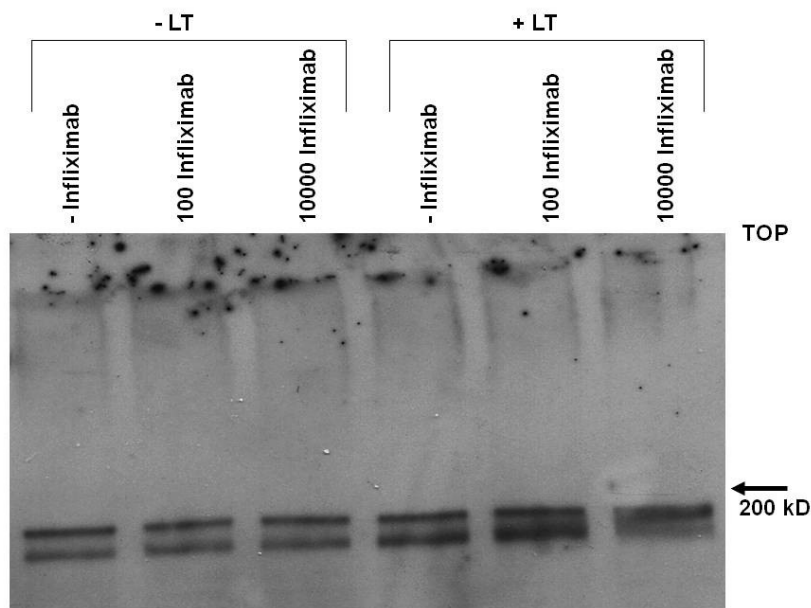
**Abbildung 23** • 16HBE14o-Zellen; d29 ALI; BEGM; MUC5AC-Antikörper; Stimulation über 24 Stunden von basal mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  und Hemmung von apikal mit 100 und 10000 pg/ml Infliximab. Bei 10000 pg/ml Infliximab geringere Mucin-Sekretion



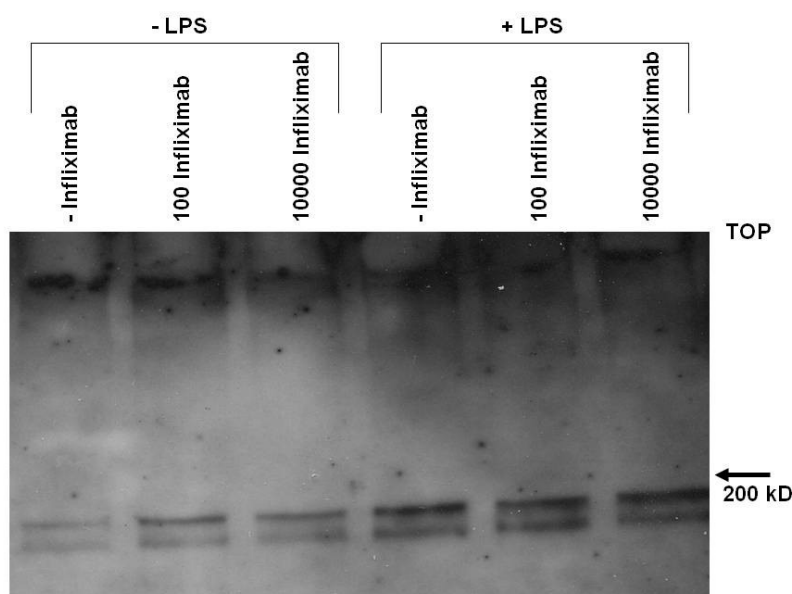
**Abbildung 24** • 16HBE14o-Zellen; d29 ALI; BEGM; MUC5AC-Antikörper; Stimulation über 24 Stunden von basal mit 10 ng/ml TNF- $\alpha$  und Hemmung von apikal mit 100 und 10000 pg/ml Infliximab. Geringere Mucin-Sekretion bei Hemmung mit Infliximab

#### 4.4.2 Hemmung bei Stimulation mit anderen Mediatoren

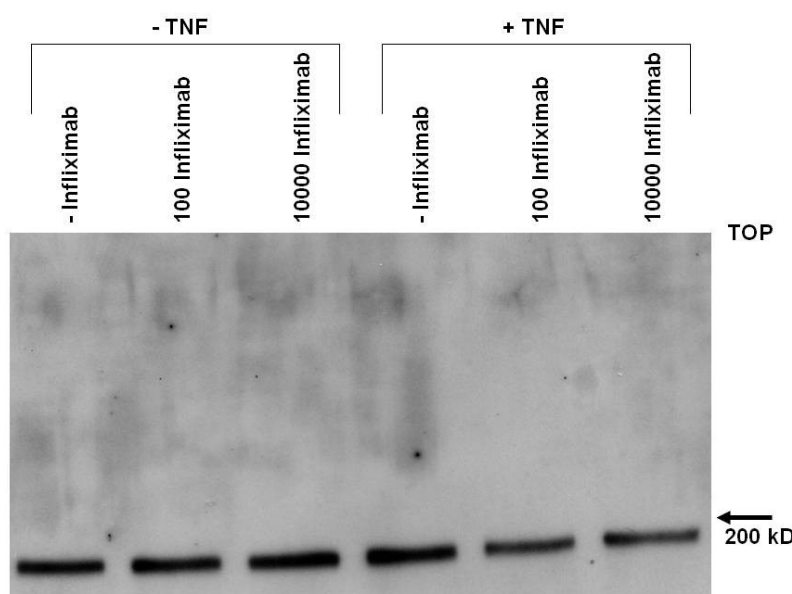
Wie bereits in Kapitel 4.3 beschrieben wird die Mucin-Sekretion durch LT- $\alpha$  (TNF- $\beta$ ) und Lipopolysaccharid von *Pseudomonas aeruginosa* stimuliert. Bei Zugabe von Infliximab konnte die durch LT- $\alpha$  induzierte Mucin-Sekretion gehemmt werden (Abbildung 25), die durch LPS induzierte Mucin-Sekretion allerdings nicht (Abbildung 26).



**Abbildung 25** • 16HBE14o-Zellen; d34 ALI; BEGM; MUC5B-Antikörper; Stimulation über 24 Stunden von basal mit 100 ng/ml LT- $\alpha$  und Hemmung von basal mit 100 und 10000 pg/ml Infliximab. Geringere Mucin-Sekretion bei 10000 pg/ml Infliximab



**Abbildung 26** • 16HBE14o-Zellen; d34 ALI; BEGM; MUC5AC-Antikörper; Stimulation über 24 Stunden von basal mit 300 ng/ml LPS (*Pseudomonas aeruginosa*) und Hemmung von basal mit 100 und 10000 pg/ml Infliximab. Stimulation der Mucin-Sekretion durch LPS, keine Hemmung durch Infliximab



**Abbildung 27** • NCI-H292-Zellen; d28 ALI; BEGM; MUC5AC-Antikörper; Stimulation über 5 Tage von basal mit 20 ng/ml TNF- $\alpha$  und Hemmung von basal mit 100 und 10000 pg/ml Infliximab. Hemmung sowohl bei 100 als auch bei 10000 pg/ml

## **5 Diskussion**

### **5.1 Diskussion der Versuchsergebnisse**

#### **5.1.1 Versuchsaufbau**

Der erste Teil der hier vorliegenden Arbeit befasste sich mit der Optimierung der Versuchsbedingungen für den eigentlichen Versuch. Es wurden unterschiedliche Vorbehandlungen des Air/Liquid-Interface-Systems, verschiedene Zellkulturmedien, Häufigkeit und Menge der Mediumgabe, Gewinnung der Zellsekretionen und nicht zuletzt Konzentration und Dauer der Stimulation mit TNF- $\alpha$  getestet.

Die Voruntersuchungen zum Versuchsaufbau zeigten, dass es für Zelllinien, die lange über die Konfluenz hinaus verwendet werden, keinen Unterschied macht, ob man die einzelnen Wells vor Versuchsbeginn mit Kollagen vorbeschichtet. Das kann daran liegen, dass die Zellen nach Konfluenz frühestens nach 14 Tagen für Versuche verwendet wurden und die Vorbeschichtung der Wells nur für die Adhärenz von präkonfluenten Zellen auf der Membran eine Rolle spielt.

Weiterhin zeigte sich ein deutlicher Vorteil darin, die Oberfläche der Zellen vor Versuchsbeginn (d.h. mindestens zwei Wochen nach Konfluenz und vor Beginn der Stimulation) zu Waschen, indem man PBS auf die Zelloberfläche gibt und sie durch zehnmaliges Aspirieren und waschen reinigt. Bei der Entnahme der Proben zeigte sich ein Vorteil, wenn man eine geringere Menge PBS (300  $\mu$ l) mit 1mM DTT verwendet und dieses nach Aufbringen auf die Zelloberfläche noch 30 Minuten im Brutschrank inkubiert, bevor man die Probe entnimmt, indem man sie wie oben beschrieben abwäscht.

Bei den verschiedenen erhältlichen Medien zeigte sich für die Atemwegszelllinien 16HBE14o- und 1HAEO ein deutlicher Vorteil bei Verwendung des BEGM (bronchial epithelium cell growth medium) gegenüber MEM, DMEM und F12-Medium, so dass für alle weiteren Versuche BEGM-Medium mit den entsprechenden Zusätzen verwendet wurde.

Nach Konfluenz der Zellen ist es möglich, die Zellen von basal täglich oder alle zwei Tage mit entweder einem oder zwei Millilitern Zellkulturmedium zu versorgen. Hier sind deutlich bessere Mucin-Ausbeuten mit der Gabe von täglich zwei Millilitern Medium zu erreichen, was für alle weiteren Versuche übernommen wurde.

Die optimalen Zellkulturbedingungen, die für alle weiteren Versuche verwendet wurden, sind also folgende:

1. Unbeschichtete Wells
2. Tägliche Versorgung der Zellen mit 2ml BEGM-Medium
3. Waschen der Zelloberfläche mit PBS vor Versuchsbeginn
4. Zum Herunterwaschen der Proteine von der Zelloberfläche Inkubation mit 300  $\mu$ l PBS mit 1mM DTT für 30 Minuten

#### **5.1.2 TNF-alpha stimuliert die Mucin-Sekretion**

Wir konnten mit Hilfe von spezifischen polyklonalen Antikörpern gegen MUC5AC und MUC5B und die daran anschließende Darstellung der markierten Proteine mittels Western Blot zeigen, dass TNF- $\alpha$  eine dosisabhängige Erhöhung der Mucin-Sekretion in humanen Atemwegsepithelien auslöst. und dass die Mucin-Sekretion durch Verlängerung der Expositionszeit von TNF- $\alpha$  gesteigert werden.

Es wurde bereits gezeigt, dass die Mucin-Genexpression durch TNF- $\alpha$  heraufreguliert werden kann, bzw. dass die Mucin-Produktion durch posttranskriptionelle Beeinflussung erhöht wird, aber auch dass TNF- $\alpha$  eine Mucin-Sekretion in den Atemwegen auslöst (2; 21; 53).

Borchers et al. beschrieben 1999, dass es durch die Stimulation mit TNF- $\alpha$  zwar zu einer Erhöhung der mRNA-Level von MUC5AC kommt, nicht aber der mRNA-Level von MUC5B (7).



Das heißt wiederum, dass die Steigerung der Mucin-Sekretion durch TNF- $\alpha$  zumindest zum Teil – und für MUC5B wahrscheinlich vollständig – über posttranskriptionelle Wege läuft. Möglich wäre, dass es bei einer Entzündungsreaktion initial zu einer gesteigerten Abgabe bereits gespeicherter Mucin-Glykoproteine und im weiteren Verlauf über eine posttranskriptionale Erhöhung der Stabilität der mRNA zu einer gesteigerten Mucin-Sekretion kommt (59).

Des Weiteren konnten wir mittels Western Blot zeigen, dass auch Lipopolysaccharid (LPS) von *Pseudomonas aeruginosa* und Lymphotoxin- $\alpha$  (LT- $\alpha$ ) eine Steigerung der Mucin-Sekretion hervorrufen. Hierbei war die Stimulation mit LPS zwar stärker als die Basalrate, aber nicht so stark wie durch TNF- $\alpha$ . Die Stimulation mit LT- $\alpha$  bei Dosierungen von 100 – 200 ng/ml (gegenüber 20 ng/ml TNF- $\alpha$ ) scheint eine höhere Mucin-Sekretion hervorzurufen. Aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit lässt sich für LT- $\alpha$  vermuten, dass der Signalweg der gleiche ist wie für TNF- $\alpha$  (41).

### **5.1.3 Entzündungsbedingte Mucin-Sekretion lässt sich mit Infliximab hemmen**

Wir konnten zeigen, dass die durch TNF- $\alpha$  hervorgerufene Stimulation der Mucin-Sekretion bei gleichzeitiger Gabe des TNF- $\alpha$ -Antikörpers Infliximab von basal, d.h. ebenso wie TNF- $\alpha$  in das Zellkulturmedium, gehemmt werden konnte (Abbildung 21, Abbildung 22). Da Infliximab lösliches und membrangebundenes TNF- $\alpha$  bindet, muss allerdings davon ausgegangen werden, dass ein Großteil des TNF- $\alpha$  bereits vor Bindung an seine Rezeptoren von den Antikörpern abgefangen wird.

Es zeigte sich allerdings auch, dass Infliximab selbst eine gewisse Mucin-Hypersekretion auslöst (Abbildung 21, Abbildung 22). Es ist bekannt, dass Infliximab neben der Bindung von löslichem TNF- $\alpha$  auch an membrangebundenes TNF- $\alpha$  binden und damit eine komplementvermittelte Zerstörung der TNF- $\alpha$ -exprimierenden Zelle auslösen kann. Diese komplementvermittelte Reaktion ist *in vitro* aber nicht zu erwarten, da die Zerstörung und Abräumung der Zellen nur *in*

*vivo* stattfindet. Des Weiteren kann Infliximab bei speziellen Zelltypen (beschrieben für T-Zellen und Monozyten) Apoptose auslösen (38). Es ist nun möglich, dass entweder Infliximab selbst oder der Komplex aus Infliximab und daran gebundenem TNF- $\alpha$  diese Steigerung der Mucin-Sekretion auslösen. Der genaue Mechanismus dahinter bleibt zu klären.

In der vorliegenden Studie konnten wir zeigen, dass die Mucin-Sekretion konfluenter Zellen, die von basal mit TNF- $\alpha$  stimuliert werden, durch die apikale Gabe von Infliximab gehemmt werden kann. (Abbildung 23, Abbildung 24). Diese konfluenten Zellen besitzen Tight junctions und wachsen in mehreren Schichten auf der Air/Liquid-Interface-Membran, so dass nicht davon auszugehen ist, dass das von apikal zugegebene Infliximab in direkten Kontakt mit dem von basal verabreichten TNF- $\alpha$  kommt.

Es lässt sich vermuten, dass entweder TNF- $\alpha$  trans- oder diazellulär nach apikal gelangt und dort inaktiviert wird oder dass Infliximab auf gleichem Weg nach basal dringt. Des Weiteren wäre es möglich, dass das TNF- $\alpha$  eine Entzündungsreaktion unterhält, die auch zu einer Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Konzentrationen auf der apikalen Seite der Zellen führt und daher von Infliximab gehemmt werden kann. Eine weitere Möglichkeit wäre, dass das Infliximab membrangebundenes TNF- $\alpha$  bindet.

Durch weitere Versuche bleibt zu klären, auf welchem Weg das von apikal verabreichte Infliximab die Mucin-Hypersekretion hemmt. Ein möglicher Versuchsaufbau wäre, zunächst infliximab von apikal auf die Zellen zu geben, es nach einer Inkubationszeit herunterzuwaschen und schließlich die Zellen von basal mit TNF- $\alpha$  zu stimulieren. Findet dann eine Hemmung der Mucin-Sekretion statt, kann diese nicht durch eine direkte Antikörper-Reaktion hervorgerufen werden.

Ein weiteres Ergebnis dieser Studie ist es, dass auch LT- $\alpha$  eine Mucin-Hypersekretion hervorruft, was bisher in keiner Studie veröffentlicht wurde. Auch diese gesteigerte Mucin-Sekretion lässt sich bei Zugabe von Infliximab hemmen. Da LT- $\alpha$  eine große strukturelle Ähnlichkeit mit TNF- $\alpha$  besitzt und ebenfalls über

die Rezeptoren TNF-R1 und TNF-R2 wirkt (41), ist es wie bei TNF- $\alpha$  entweder eine Kreuzreaktion des Infliximab-Antikörpers oder LT- $\alpha$  führt zu einer Erhöhung der TNF- $\alpha$ -Konzentration auf der apikalen Seite, die im Anschluss daran durch Infliximab gehemmt wird.

Lipopolysaccharid (LPS) von *Pseudomonas aeruginosa* löst ebenfalls eine – wenn auch geringere – Mucin-Hypersekretion aus, die nicht durch Infliximab zu beeinflussen war. Dies diente als Positiv-Kontrolle, da LPS an eigene Rezeptoren (TLR-4) bindet und somit eine Mucin-Hypersekretion unabhängig vom TNF-Signalweg hervorrufen kann.

In Zusammenschau der Ergebnisse muss es also so sein, dass LPS die Mucin-Sekretion direkt und somit von TNF- $\alpha$  unabhängig stimuliert und vermutlich auch – zumindest bei den verwendeten Zelllinien – keine Produktion bzw. Freisetzung von TNF- $\alpha$  auslöst.

## 5.2 Kritische Würdigung der eigenen Untersuchungen und Ergebnisse

Zunächst ist zu bedenken, dass man mittels Western-Blot-Analyse nur semiquantitative Ergebnisse erhält, d.h. es können zwar in gewissem Maß ‚mehr‘ und ‚weniger‘ Zellsekretionen unterschieden werden, die Menge kann allerdings nicht anhand von Zahlen festgemacht und in Relation gesetzt werden. Andererseits – und das ist der große Vorteil – zeigt der Western Blot die Mucin-Sekretion selbst und nicht die intrazelluläre Komponente, die möglicherweise gar nicht in eine Sekretion umgesetzt wird oder die trotz erhöhter Mucin-Sekretion nicht wesentlich gesteigert ist (7). So konnte in den vorliegenden Untersuchungen mittels Western Blot gezeigt werden, dass obwohl keine erhöhten mRNA-Level festzustellen sind (7), die Mucin-Sekretion aus den Zellen durch TNF- $\alpha$  dennoch stimuliert wird. Mit dem Western Blot kann man somit das Endprodukt darstellen, die Mucine, die bei vielen Atemwegserkrankungen eine wichtige Rolle spielen.

Des Weiteren kann man mit Hilfe der Zellkultur lediglich Mechanismen untersuchen und einen ersten Schritt zur Überprüfung einer Hypothese machen. Es ist also nicht unbedingt zu erwarten, dass immortalisierte Atemwegsepithelzellen in der Zellkultur sich ebenso verhalten wie menschliche Schleimhaut *in vivo*. Die in der Einleitung beschriebene Becherzellmetaplasie z.B., die eine wichtige Rolle für die Mucin-Sekretion *in vivo* spielt und einer der Hauptmechanismen für die Mucin-Hypersekretion bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen ist (46), wird im Zellkulturmodell *in vitro* eher eine untergeordnete Rolle spielen. Das bedeutet im Umkehrschluß aber auch, dass die hier gezeigten Ergebnisse zumindest die Stimulation mit TNF- $\alpha$  betreffend die Reaktion menschlichen Atemwegsepithels eher unterschätzen lassen.

Hinzu kommt, dass die TNF- $\alpha$ -induzierte Mucin-Sekretion von humanen Atemwegszelllinien *in vitro* bei präkonfluenten Zellen höher ist als bei konfluenten Zellen (53). Die Autoren diskutieren hier die Entstehung einer Mucus-Gelschicht auf den konfluenten Zellen, die eine Interaktion von TNF- $\alpha$  mit den Rezeptoren behindern könnte. Eine weitere Möglichkeit ist, dass präkonfluente Zellen dem TNF- $\alpha$  nicht ausschließlich von basal sondern zumindest auch von basolateral

ausgesetzt sind. In dem hier beschriebenen Zellkultur-Modell wurden ausschließlich konfluente Zellen verwendet, die über längere Zeit dem Air-Liquid-Interface ausgesetzt waren, so dass beide o.g. Hypothesen hier eher keine Rolle spielen.

*In vivo* sind Atemwegsepithelien bei Entzündungen nicht nur von basal sondern auch von apikal den erhöhten TNF- $\alpha$ -Konzentrationen ausgesetzt, da z.B. bei Asthma bronchiale auch in der bronchoalveolären Flüssigkeit erhöhte TNF- $\alpha$ -Konzentrationen zu finden sind, was entweder das Ergebnis einer Schrankenstörung oder einer entzündungsbedingt gesteigerten intraluminalen Produktion ist (10). Für eine endobronchiale Anwendung von Infliximab *in vivo* würde das bedeuten, dass Infliximab nicht nur den hier gezeigten hemmenden Effekt hätte, sondern zusätzlich noch direkt das endobronchiale TNF- $\alpha$  abfangen könnte.

Auch ist die Hemmung mit Infliximab von apikal versuchsbedingt nur über 24 Stunden möglich, während in den Vorversuchen die Stimulation mit TNF- $\alpha$  über insgesamt zwei Wochen durchgeführt wurde und eine konstant gesteigerte Mucin-Sekretion zeigte (Abbildung 15). Das legt nahe, dass der hemmende Effekt von Infliximab, wenn es ebenfalls kontinuierlich über zwei Wochen appliziert wird, ebenfalls stärker ausgeprägt ist als nur bei einer Hemmung von 24 Stunden. Andererseits lassen einige der Versuche vermuten, dass Infliximab selbst zumindest in geringem Maße die Mucin-Sekretion induzieren kann (Abbildung 21, Abbildung 22).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass es methodisch schwer ist, all diese Zusammenhänge in der Zellkultur zu untersuchen. Es konnte gezeigt werden, dass eine länger andauernde Stimulation mit TNF- $\alpha$  eine deutlich höhere Mucin-Sekretion ergibt. Die Gabe von Infliximab von apikal bedeutet aber, dass man diese Zellsekretion herunterwäscht, so dass eine länger andauernde Exposition nicht zu erreichen ist.

### **5.3 Bedeutung der Untersuchung, Schlussfolgerung, Konsequenzen und Ausblick**

Die hier vorliegende Untersuchung gibt einen Hinweis darauf, dass eine endobronchiale Anwendung von Infliximab insbesondere bei chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen helfen kann, die entzündungsbedingte und TNF- $\alpha$ -vermittelte Mucin-Hypersekretion, die eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie dieser Erkrankungen spielt, zu unterdrücken.

Ein wesentlicher Vorteil dieser Art der Anwendung kann es sein, dass man im Gegensatz zur bisherigen systemischen Anwendung bei Morbus Crohn, Colitis ulcerosa und rheumatischen Erkrankungen mit deutlich geringeren Nebenwirkungen rechnen muss. Es sind gerade diese gravierenden und häufig auftretenden Nebenwirkungen, die Infliximab ausschließlich zu einem Reservemedikament machen, das bei Unverträglichkeit oder unzureichender Wirksamkeit aller herkömmlicher Therapien eingesetzt wird.

Verglichen mit anderen Applikationsmöglichkeiten bietet die endobronchiale Gabe von Medikamenten bei chronisch entzündlichen Atemwegserkrankungen wichtige Vorteile, z.B. benötigt man weniger Wirkstoff, die Wirkung tritt schneller ein und nicht zuletzt gibt es weniger unerwünschte Nebenwirkungen. Insbesondere bei den o.g. Nebenwirkungen von Infliximab wäre eine endobronchiale Applikationsform, z.B. mittels eines Dosieraerosols eine interessante Alternative. Bislang gibt es bereits Inhalationstherapien zur Verringerung der Atemwegskonstriktion, zur Verbesserung der Mucus-Clearance und auch zur Entzündungs- und Infektionshemmung.

Bevor man allerdings an eine therapeutische Anwendung von Infliximab bei chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen denken kann, müssten noch weitere Untersuchungen die hier gezeigten Ergebnisse bestätigen. Zunächst sollten identische Versuche auch mit NHBE (natural human bronchial epithelium) diese Ergebnisse liefern, woraufhin ein nächster Schritt ein Tiermodell sein könnte.

## **6 Zusammenfassung**

### **6.1 Einleitung**

Die Bedeutung der chronisch obstruktiven Atemwegserkrankungen nimmt stetig zu. Zu diesen Krankheiten gehören u.a. die COPD, das Asthma bronchiale und die Zystische Fibrose. Alle diese Krankheiten haben eine Mucus-Hypersekretion und eine Obstruktion der Atemwege mit einem deutlich erhöhten Entzündungsrisiko gemein.

### **6.2 Fragestellung**

Ziel der Untersuchung war es neben der Etablierung und Optimierung eines ALI-Zellkultursystems herauszufinden, ob man eine mit TNF- $\alpha$  stimulierte Mucin-Hypersekretion mit dem TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab hemmen kann.

### **6.3 Material und Methoden**

In der Zellkultur wurden verschieden humane Atemwegsepithelzelllinien mit unterschiedlichen Medien versorgt. Weiterhin wurden die Bedingungen der Zellkultur, die Vorbereitung der ALI-Inserts, die Menge des Zellkulturmediums, die Häufigkeit der Zellversorgung und die Probengewinnung optimiert.

Zur Stimulation der Zellen wurden TNF- $\alpha$ , LPS von *Pseudomonas aeruginosa* und LT- $\alpha$ , zur Hemmung der TNF- $\alpha$ -Antikörper Infliximab verwendet.

Die Untersuchung der gewonnenen Zellsekretionen erfolgte mittels Western-Blot-Analyse.

### **6.4 Ergebnisse**

TNF- $\alpha$  stimuliert dosis- und zeitabhängig die Mucin-Sekretion bei humanen Atemwegszelllinien. Die durch TNF- $\alpha$  induzierte Mucin-Sekretion kann mittels Infliximab gehemmt werden, auch wenn TNF- $\alpha$  von basal und Infliximab von apikal verabreicht werden.

Auch LT- $\alpha$  und LPS von *Pseudomonas aeruginosa* können eine Mucin-Sekretion auslösen, wobei sich die durch LT- $\alpha$  ausgelöste Hypersekretion durch Infliximab hemmen lässt, die durch LPS lässt sich auf diese Weise nicht hemmen.

### **6.5 Schlussfolgerung**

Infliximab könnte bei topischer Anwendung, z.B. als Aerosol, die TNF- $\alpha$ -vermittelte Entzündungsreaktion und damit die Mucin-Hypersekretion bei chronischen Atemwegserkrankungen hemmen, ohne dabei die gravierenden Nebenwirkungen der systemischen Gabe auszulösen.



## **7 Summary**

### **7.1 Introduction**

The burden of chronic obstructive airway diseases increases daily. Among these diseases are chronic obstructive pulmonary disease (COPD), bronchial asthma and cystic fibrosis (CF). Common features are a hypersecretion of airway mucus and an obstruction of the airways with a highly elevated risk of inflammation.

### **7.2 Problem**

Aside from the establishment and optimisation of an ALI cell culture system the main objective of this thesis was to find out whether mucin hypersecretion caused by TNF- $\alpha$  stimulation could be inhibited by Infliximab.

### **7.3 Methods**

Different human airways epithelium cell lines were supplied with varying cell culture media. Furthermore, the cell culture conditions, the preparation of the ALI inserts, the quantity of cell culture medium, the frequency of medium supply, and the retrieval of the samples were optimized.

Cells were stimulated with TNF- $\alpha$ , LPS of *Pseudomonas aeruginosa*, and LT- $\alpha$ , Infliximab was used for inhibition.

All samples were submitted to Western blot analysis.

### **7.4 Results**

TNF- $\alpha$  dose- and time-dependently stimulates mucin secretion in human airway epithelium cell lines. This increase in mucin secretion can be inhibited by Infliximab, even in the case of a basal stimulation with TNF- $\alpha$  and apical inhibition with Infliximab.

LT- $\alpha$  and LPS of *Pseudomonas aeruginosa* can also trigger mucin secretion, whereas hypersecretion caused by LT- $\alpha$  can be inhibited by Infliximab, hypersecretion caused by LPS can not.

## **7.5 Discussion**

Topical admission of Infliximab, e.g. as an aerosol, could inhibit inflammation mediated by TNF- $\alpha$  and thereby reduce mucin hypersecretion in chronic obstructive airway diseases without causing the grave adverse effects of systemic admission.

## 8 Literaturverzeichnis

1. **Abholz, H. H., Gillissen, A., Magnussen, H., Schott, G., Schultz, K., Ukena, D., and Worth, H.;** *Nationale Versorgungsleitlinie COPD*. 2008;
2. **Adler, K. B., Fischer, B. M., Li, H., Choe, N. H., and Wright, D. T.;** *Hypersecretion of mucin in response to inflammatory mediators by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro is blocked by inhibition of nitric oxide synthase*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1995;13:526-530.
3. **Barnes, P. J.;** *Cytokines as mediators of chronic asthma*. *Am.J.Respir.Crit Care Med.* 1994;150:S42-S49.
4. **Baud, V. and Karin, M.;** *Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives*. *Trends Cell Biol.* 2001;11:372-377.
5. **Berger, J. T., Voynow, J. A., Peters, K. W., and Rose, M. C.;** *Respiratory carcinoma cell lines. MUC genes and glycoconjugates*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1999;20:500-510.
6. **Biesbrock, A. R., Bobek, L. A., and Levine, M. J.;** *MUC7 gene expression and genetic polymorphism*. *Glycoconj.J.* 1997;14:415-422.
7. **Borchers, M. T., Carty, M. P., and Leikauf, G. D.;** *Regulation of human airway mucins by acrolein and inflammatory mediators*. *Am.J.Physiol.* 1999;276:L549-L555.
8. **Buisine, M. P., Devisme, L., Copin, M. C., Durand-Reville, M., Gosselin, B., Aubert, J. P., and Porchet, N.;** *Developmental mucin gene expression in the human respiratory tract*. *Am.J.Respir.Cell Mol.Biol.* 1999;20:209-218.

9. **Carraway, K. L., Perez, A., Idris, N., Jepson, S., Arango, M., Komatsu, M., Haq, B., Price-Schiavi, S. A., Zhang, J., and Carraway, C. A.;** *Muc4/sialomucin complex, the intramembrane ErbB2 ligand, in cancer and epithelia: to protect and to survive.* Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol. 2002;71:149-85.:149-185.
  
10. **Cembrzynska-Nowak, M., Szklarz, E., Inglot, A. D., and Teodorczyk-Injeyan, J. A.;** *Elevated release of tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma by bronchoalveolar leukocytes from patients with bronchial asthma.* Am.Rev.Respir.Dis. 1993;147:291-295.
  
11. **Chen, G. and Goeddel, D. V.;** *TNF-R1 signaling: a beautiful pathway.* Science. 2002;296:1634-1635.
  
12. **Cohn, L., Elias, J. A., and Chupp, G. L.;** *Asthma: mechanisms of disease persistence and progression.* Annu.Rev.Immunol. 2004;22:789-815.:789-815.
  
13. **Cozens, A. L., Yezzi, M. J., Kunzelmann, K., Ohrui, T., Chin, L., Eng, K., Finkbeiner, W. E., Widdicombe, J. H., and Gruenert, D. C.;** *CFTR expression and chloride secretion in polarized immortal human bronchial epithelial cells.* Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 1994;10:38-47.
  
14. **Davies, J. R., Herrmann, A., Russell, W., Svitacheva, N., Wickstrom, C., and Carlstedt, I.;** *Respiratory tract mucins: structure and expression patterns.* Novartis.Found.Symp. 2002;248:76-88; discussion 88-93, 277-82.:76-88.
  
15. **Davies, J. R., Hovenberg, H. W., Linden, C. J., Howard, R., Richardson, P. S., Sheehan, J. K., and Carlstedt, I.;** *Mucins in airway secretions from healthy and chronic bronchitic subjects.* Biochem.J. 1996;313:431-439.
  
16. **Davies, J. R., Svitacheva, N., Lannefors, L., Kornfalt, R., and Carlstedt, I.;** *Identification of MUC5B, MUC5AC and small amounts of MUC2 mucins in cystic fibrosis airway secretions.* Biochem.J. 1999;344 Pt 2:321-30.:321-330.

17. **Degroote, S., Maes, E., Humbert, P., Delmotte, P., Lamblin, G., and Roussel, P.;** *Sulfated oligosaccharides isolated from the respiratory mucins of a secretor patient suffering from chronic bronchitis.* Biochimie. 2003;85:369-379.
  
18. **Dorscheid, D. R., Conforti, A. E., Hamann, K. J., Rabe, K. F., and White, S. R.;** *Characterization of cell surface lectin-binding patterns of human airway epithelium.* Histochem.J. 1999;31:145-151.
  
19. **DUNNILL, M. S.;** *The pathology of asthma, with special reference to changes in the bronchial mucosa.* J.Clin.Pathol. 1960;13:27-33.:27-33.
  
20. **Enss, M. L., Schmidt-Wittig, U., Muller, H., Mai, U. E., Coenen, M., and Hedrich, H. J.;** *Response of germfree rat colonic mucous cells to peroral endotoxin application.* Eur.J.Cell Biol. 1996;71:99-104.
  
21. **Fischer, B. M., Rochelle, L. G., Voynow, J. A., Akley, N. J., and Adler, K. B.;** *Tumor necrosis factor-alpha stimulates mucin secretion and cyclic GMP production by guinea pig tracheal epithelial cells in vitro.* Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 1999;20:413-422.
  
22. **Fu, Y. X., Huang, G., Matsumoto, M., Molina, H., and Chaplin, D. D.;** *Independent signals regulate development of primary and secondary follicle structure in spleen and mesenteric lymph node.* Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A 1997;94:5739-5743.
  
23. **Groneberg, D. A., Eynott, P. R., Oates, T., Lim, S., Wu, R., Carlstedt, I., Nicholson, A. G., and Chung, K. F.;** *Expression of MUC5AC and MUC5B mucins in normal and cystic fibrosis lung.* Respir.Med 2002;96:81-86.
  
24. **Gulsvik, A.;** *The global burden and impact of chronic obstructive pulmonary disease worldwide.* Monaldi Arch.Chest Dis. 2001;56:261-264.

25. **Hauber, H. P., Gholami, D., Koppermann, G., Heuer, H. E., Meyer, A., and Pforte, A.;** *Increased expression of Interleukin-13 but not Interleukin-4 in cystic fibrosis patients.* J.Cyst.Fibros. 2003;2:189-194.
  
26. **Henke, M. O., John, G., Germann, M., Lindemann, H., and Rubin, B. K.;** *MUC5AC and MUC5B mucins increase in cystic fibrosis airway secretions during pulmonary exacerbation.* Am.J.Respir.Crit Care Med. 2007;175:816-821.
  
27. **Henke, M. O., Renner, A., Huber, R. M., Seeds, M. C., and Rubin, B. K.;** *MUC5AC and MUC5B Mucins Are Decreased in Cystic Fibrosis Airway Secretions.* Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2004;31:86-91.
  
28. **Hovenberg, H. W., Davies, J. R., and Carlstedt, I.;** *Different mucins are produced by the surface epithelium and the submucosa in human trachea: identification of MUC5AC as a major mucin from the goblet cells.* Biochem.J 1996;318 ( Pt 1):319-324.
  
29. **Hovenberg, H. W., Davies, J. R., Herrmann, A., Linden, C. J., and Carlstedt, I.;** *MUC5AC, but not MUC2, is a prominent mucin in respiratory secretions.* Glycoconj.J. 1996;13:839-847.
  
30. **Jeffery, P. K. and Li, D.;** *Airway mucosa: secretory cells, mucus and mucin genes.* Eur.Respir.J. 1997;10:1655-1662.
  
31. **Kirkham, S., Sheehan, J. K., Knight, D., Richardson, P. S., and Thornton, D. J.;** *Heterogeneity of airways mucus: variations in the amounts and glycoforms of the major oligomeric mucins MUC5AC and MUC5B.* Biochem.J. 2002;361:537-546.
  
32. **Knowles, M. R. and Boucher, R. C.;** *Mucus clearance as a primary innate defense mechanism for mammalian airways.* J.Clin.Invest. 2002;109:571-577.

33. **Kwon, O. J., Au, B. T., Collins, P. D., Adcock, I. M., Mak, J. C., Robbins, R. R., Chung, K. F., and Barnes, P. J.;** *Tumor necrosis factor-induced interleukin-8 expression in cultured human airway epithelial cells.* Am.J.Physiol. 1994;267:L398-L405.
34. **Lamblin, G., Degroote, S., Perini, J. M., Delmotte, P., Scharfman, A., Davril, M., Lo-Guidice, J. M., Houdret, N., Dumur, V., Klein, A., and Rousse, P.;** *Human airway mucin glycosylation: a combinatorial of carbohydrate determinants which vary in cystic fibrosis.* Glycoconj.J. 2001;18:661-684.
35. **Levine, S. J., Larivee, P., Logun, C., Angus, C. W., Ognibene, F. P., and Shelhamer, J. H.;** *Tumor necrosis factor-alpha induces mucin hypersecretion and MUC-2 gene expression by human airway epithelial cells.* Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 1995;12:196-204.
36. **Li, Y., Bharti, A., Chen, D., Gong, J., and Kufe, D.;** *Interaction of glycogen synthase kinase 3beta with the DF3/MUC1 carcinoma-associated antigen and beta-catenin.* Mol.Cell Biol. 1998;18:7216-7224.
37. **Li, Y., Martin, L. D., Minnicozzi, M., Greenfeder, S., Fine, J., Pettersen, C. A., Chorley, B., and Adler, K. B.;** *Enhanced expression of mucin genes in a guinea pig model of allergic asthma.* Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2001;25:644-651.
38. **Lugering, A., Schmidt, M., Lugering, N., Pauels, H. G., Domschke, W., and Kucharzik, T.;** *Infliximab induces apoptosis in monocytes from patients with chronic active Crohn's disease by using a caspase-dependent pathway.* Gastroenterology. 2001;121:1145-1157.

39. **Ordenez, C. L., Khashayar, R., Wong, H. H., Ferrando, R., Wu, R., Hyde, D. M., Hotchkiss, J. A., Zhang, Y., Novikov, A., Dolganov, G., and Fahy, J. V.;** *Mild and moderate asthma is associated with airway goblet cell hyperplasia and abnormalities in mucin gene expression.* Am.J.Respir.Crit Care Med. 2001;163:517-523.
40. **Pigny, P., Guyonnet-Duperat, V., Hill, A. S., Pratt, W. S., Galiegue-Zouitina, S., d'Hooge, M. C., Laine, A., Van Seuningen, I., Degand, P., Gum, J. R., Kim, Y. S., Swallow, D. M., Aubert, J. P., and Porchet, N.;** *Human mucin genes assigned to 11p15.5: identification and organization of a cluster of genes.* Genomics 1996;38:340-352.
41. **Pober, J. S., Lapierre, L. A., Stolpen, A. H., Brock, T. A., Springer, T. A., Fiers, W., Bevilacqua, M. P., Mendrick, D. L., and Gimbrone, M. A., Jr.;** *Activation of cultured human endothelial cells by recombinant lymphotoxin: comparison with tumor necrosis factor and interleukin 1 species.* J.Immunol. 1987;138:3319-3324.
42. **Preciado, D., Goyal, S., Rahimi, M., Watson, A. M., Brown, K. J., Hathout, Y., and Rose, M. C.;** *MUC5B Is the predominant mucin glycoprotein in chronic otitis media fluid.* Pediatr.Res. 2010;68:231-236.
43. **Ramsey, B. W.;** *Management of pulmonary disease in patients with cystic fibrosis.* N.Engl.J.Med. 1996;335:179-188.
44. **Ratjen, F. and Doring, G.;** *Cystic fibrosis.* Lancet. 2003;361:681-689.
45. **Rogan, M. P., Geraghty, P., Greene, C. M., O'Neill, S. J., Taggart, C. C., and McElvaney, N. G.;** *Antimicrobial proteins and polypeptides in pulmonary innate defence.* Respir.Res. 2006;7:29-
46. **Rogers, D. F.;** *Airway goblet cells: responsive and adaptable front-line defenders.* Eur.Respir.J. 1994;7:1690-1706.



47. **Rogers, D. F.;** *The airway goblet cell*. Int.J.Biochem.Cell Biol. 2003;35:1-6.
48. **Rogers, D. F.;** *Physiology of airway mucus secretion and pathophysiology of hypersecretion*. Respir.Care. 2007;52:1134-1146.
49. **Rose, M. C. and Voynow, J. A.;** *Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease*. Physiol Rev. 2006;86:245-278.
50. **Rose, M. C. and Voynow, J. A.;** *Respiratory tract mucin genes and mucin glycoproteins in health and disease*. Physiol Rev. 2006;86:245-278.
51. **Shao, M. X., Nakanaga, T., and Nadel, J. A.;** *Cigarette smoke induces MUC5AC mucin overproduction via tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme in human airway epithelial (NCI-H292) cells*. Am.J.Physiol Lung Cell Mol.Physiol. 2004;287:L420-L427.
52. **Shimizu, T., Takahashi, Y., Kawaguchi, S., and Sakakura, Y.;** *Hypertrophic and metaplastic changes of goblet cells in rat nasal epithelium induced by endotoxin*. Am.J.Respir.Crit Care Med. 1996;153:1412-1418.
53. **Smirnova, M. G., Birchall, J. P., and Pearson, J. P.;** *TNF-alpha in the regulation of MUC5AC secretion: some aspects of cytokine-induced mucin hypersecretion on the in vitro model*. Cytokine. 2000;12:1732-1736.
54. **Smirnova, M. G., Guo, L., Birchall, J. P., and Pearson, J. P.;** *LPS up-regulates mucin and cytokine mRNA expression and stimulates mucin and cytokine secretion in goblet cells*. Cell Immunol. 2003;221:42-49.
55. **Strieter, R. M., Belperio, J. A., and Keane, M. P.;** *Cytokines in innate host defense in the lung*. J.Clin.Invest. 2002;109:699-705.

56. **Thornton, D. J., Carlstedt, I., Howard, M., Devine, P. L., Price, M. R., and Sheehan, J. K.;** *Respiratory mucins: identification of core proteins and glycoforms.* Biochem.J. 1996;316:967-975.
57. **Thornton, D. J., Rousseau, K., and McGuckin, M. A.;** *Structure and function of the polymeric mucins in airways mucus.* Annu.Rev.Physiol 2008;70:459-486.
58. **Vestbo, J.;** *Epidemiological studies in mucus hypersecretion.* Novartis.Found.Symp. 2002;248:3-12; discussion 12-9, 277-82.:3-12.
59. **Voynow, J. A., Young, L. R., Wang, Y., Horger, T., Rose, M. C., and Fischer, B. M.;** *Neutrophil elastase increases MUC5AC mRNA and protein expression in respiratory epithelial cells.* Am.J.Physiol. 1999;276:L835-L843.
60. **Whitcutt, M. J., Adler, K. B., and Wu, R.;** *A biphasic chamber system for maintaining polarity of differentiation of cultured respiratory tract epithelial cells.* In Vitro Cell Dev.Biol. 1988;24:420-428.
61. **Wickstrom, C., Christersson, C., Davies, J. R., and Carlstedt, I.;** *Macromolecular organization of saliva: identification of 'insoluble' MUC5B assemblies and non-mucin proteins in the gel phase.* Biochem.J. 2000;351 Pt 2:421-428.
62. **Wickstrom, C., Davies, J. R., Eriksen, G. V., Veerman, E. C., and Carlstedt, I.;** *MUC5B is a major gel-forming, oligomeric mucin from human salivary gland, respiratory tract and endocervix: identification of glycoforms and C-terminal cleavage.* Biochem.J. 1998;334:685-693.
63. **Yamaya, M., Finkbeiner, W. E., Chun, S. Y., and Widdicombe, J. H.;** *Differentiated structure and function of cultures from human tracheal epithelium.* Am.J.Physiol. 1992;262:L713-L724.

64. Young, H. W., Williams, O. W., Chandra, D., Bellinghausen, L. K., Perez, G., Suarez, A., Tuvim, M. J., Roy, M. G., Alexander, S. N., Moghaddam, S. J., Adachi, R., Blackburn, M. R., Dickey, B. F., and Evans, C. M.; *Central role of Muc5ac expression in mucous metaplasia and its regulation by conserved 5' elements*. Am.J.Respir.Cell Mol.Biol. 2007;37:273-290.

## **9 Anhang**

### **9.1 Lebenslauf**

#### **9.1.1 Persönliche Daten**

#### **9.1.2 Werdegang**

Die Seiten 76 – 77 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind daher nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

Die Seiten 76 – 77 (Lebenslauf) enthalten persönliche Daten. Sie sind daher nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.

## 9.2 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celcius
µl	Mikroliter
6-MP	6-Mercaptopurin
ALI	Air/Liquid Interface
ARDS	acute respiratory distress syndrome
AZA	Azathioprin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CD	Cluster of Differentiation
CF	Cystische Fibrose (Mukoviszidose)
CFTR	Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
COPD	Chronic obstructive pulmonary disease
d	Tag
DNA	Desoyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
EGF	Epidermal Growth Factor
ENaC	epithelialer Natriumkanal
h	Stunde
hEGF	human EGF
HRP	Horseradish-Peroxidase
IgA	Immunglobulin A
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
kDa	Kilodalton
KLH	Keyhole Limpet Hämocyanin
LPS	Lipopolysaccharid
LT-α	Lymphotoxin α (auch Tumor Nekrose Faktor β)
LT-β	Lymphotoxin β
mA	Milliampere
min	Minute

ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNA	messenger RNA
MUC	Mucin
NF- $\kappa$ B	Nuclear factor kappa B
ng	Nanogramm
NHBE	Natural Human Bronchial Epithelium
nm	Nanometer
p.a.	pro analysis
PBS	Phosphate buffered saline
pg	Picogramm
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	rounds per minute
TNF-R	TNF-Rezeptor
TNF- $\alpha$	Tumor Nekrose Faktor $\alpha$
TNF- $\beta$	Tumor Nekrose Faktor $\beta$ (auch Lymphotoxin $\alpha$ )
V	Volt
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

### **9.3 Danksagungen**

Folgenden Personen möchte ich besonders danken, da ohne sie die Erstellung der vorliegenden Dissertation nicht möglich gewesen wäre:

Markus Henke, Thomas Damm, Dieter Mann, Michael Schnabel, Beate Kleb, Gerrit John



#### **9.4 Verzeichnis der akademischen Lehrer**

##### **Meine akademischen Lehrer in Marburg waren die Damen und Herren:**

Aumüller, Barth, Baum, Bauer, Basler, Bien, Czubayko, Eilers, Feuser, Funck, Geks, Geus, Görg, Gotzen, Griss, Heeg, Hellmeyer, Herzum, Kern, Kill, Klenk, Klose, Koolmann, Kroh, Kroll, Kühne, Langer, Lemke, Leppek, Lohoff, Maisch, Mann, Max, Mennel, Moll, Moosdorf, Müller, Neubauer, Oertel, Printz, Richter, Röhm, Rosenow, Rothmund, Ruchholtz, Schäfer, Schnabel, Seitz, Sekundo, Seyberth, Steiniger, Stiletto, Vogelmeier, Vogt, Walthers, Weihe, Werner, Westermann, Wilke, Wulf, Zettl